



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
FUNCIONAL DE LA ADN POLIMERASA 4
DE *Schizosaccharomyces pombe***

Arancha Sánchez Sánchez
Madrid, 2009

Memoria presentada por Arancha Sánchez Sánchez para optar al Grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2009

El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM), bajo la dirección del Dr. Luis Blanco Dávila, Profesor de Investigación del CSIC.

A mis padres
A mi hermana
A mi sobrino
A la memoria de
mi abuela

*"We totally missed the possible role of...[DNA] repair although...
I later came to realise that DNA is so precious that probably many
distinct repair mechanisms would exist."*

Francis Crick (1974). The double helix: a personal view.
Nature 248, 766–769.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Las ADN polimerasas.....	7
2. Mantenimiento de la estabilidad genómica.....	9
3. Sistemas de reparación del daño en el ADN.....	10
3.1. Reparación por escisión de base (BER).....	10
3.1.1. Pol β : un modelo de ADN polimerasa de reparación.....	13
3.2. Reparación por escisión de nucleótido (NER).....	15
3.3. Reparación de apareamientos erróneos (MMR).....	16
3.4. Reparación de roturas de doble cadena en el ADN.....	16
3.4.1. Mecanismos de recombinación homóloga (HR).....	17
3.4.2. Mecanismos de unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	19
4. Mecanismos de tolerancia al daño en el ADN.....	21
5. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : Modelo de organismo eucariota.....	22
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1. Identificación de la ADN polimerasa 4 de <i>S. pombe</i>	27
2. Análisis filogenético.....	27
3. Material biológico.....	27
3.1. Cepa de <i>Escherichia coli</i>	27
3.2. Cepas de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	27
3.3. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
4. Vectores de expresión.....	28
5. Medios de cultivo.....	29
5.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	29
5.2. Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	29
5.3. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	30
6. Enzimas, reactivos, nucleótidos y oligonucleótidos.....	30
6.1. Enzimas.....	30
6.2. Reactivos.....	30
6.3. Nucleótidos.....	30
6.4. Oligonucleótidos.....	30
7. Métodos de transformación celular.....	32
7.1. Transformación de <i>E. coli</i>	32
7.2. Transformación de <i>S. pombe</i>	32
8. Interrupción génica.....	33
9. Detección de moléculas de ADN o <i>Southern blot</i>	33
10. Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana o <i>Western blot</i>	33
11. Purificación de proteínas.....	34
11.1. Purificación de la ADN polimerasa 4 de <i>S. pombe</i>	34
11.2. Purificación de la Pol η (Eso1) de <i>S. pombe</i>	34
12. Mutagénesis dirigida por PCR.....	35
13. Preparación de extractos celulares totales.....	35
14. Ensayo de actividad 3' \rightarrow 5' exonucleasa.....	35

15. Ensayo de actividad polimerasa.....	36
15.1. Ensayo de actividad polimerasa con ADN activado.....	36
15.2. Ensayo de actividad polimerasa dependiente de molde.....	36
15.2.1. Análisis de procesividad.....	36
15.2.2. Análisis de fidelidad en moléculas que contienen un hueco de un nucleótido con un grupo fosfato en 5'	36
15.2.3. Análisis de incorporación de rNTPs.....	37
15.2.4. Análisis de incorporación de rNTPs en un sustrato tipo molde/ cebador abierto.....	37
15.2.5. Ensayo de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal).....	37
15.2.6. Análisis de dislocación mediada por deslizamiento.....	38
15.2.7. Análisis de dislocación mediada por la selección de dNTP.....	38
15.2.8. Análisis de recolocación del cebador.....	38
15.2.9. Análisis de la capacidad de desplazar banda e incorporar dNTPs.....	39
15.2.10. Análisis de inserción frente a la base modificada 8-oxoG.....	39
15.2.11. Análisis de extensión desde pares cuya base molde es 8-oxoG.....	39
16. Ensayos de retraso en gel (EMSA).....	40
17. Ensayo de actividad desoxirribosafosfato liasa (dRP liasa).....	40
18. Ensayo de reducción con NaBH ₄	41
19. Ensayo de reparación por escisión de base.....	41
20. Ensayo de actividad AP liasa.....	41
21. Análisis genético de la sensibilidad a agentes genotóxicos mediante test de gota.....	41
22. Análisis genético de la sensibilidad a MMS mediante cuvas de viabilidad.....	42
23. Sincronización de <i>S. pombe</i> en la fase G1 del ciclo celular mediante la eliminación del N ₂ del medio.....	42
24. Análisis genético de la sensibilidad a IR mediante curvas de viabilidad.....	42
25. Análisis de la frecuencia de mutación espontánea e inducida (Ensayo de resistencia a canavanina).....	42
RESULTADOS.....	43
I. Análisis estructura-función de la ADN polimerasa 4 de <i>S. pombe</i>..	43
1. Identificación de una nueva ADN polimerasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	43
2. Filogenia.....	43
3. Clonaje y purificación de la ADN polimerasa 4 de <i>S. pombe</i>	45
4. SpPol4 tiene expresión nuclear.....	47
5. Actividad ADN polimerasa intrínseca a SpPol4.....	47
6. SpPol4 carece de actividad 3'→5' exonucleasa.....	48
7. Caracterización bioquímica de SpPol4.....	48
7.1. Análisis de procesividad de SpPol4.....	48
7.2. Análisis de afinidad de unión de SpPol4 al ADN.....	49
7.3. Análisis de fidelidad de SpPol4.....	51
7.4. Incorporación de ribonucleótidos por SpPol4.....	52
7.4.1. SpPol4 inserta rNTPs y dNTPs con la misma eficiencia.....	53
7.4.2. SpPol4 intercala rNTPs en el ADN que inhiben la polimerización.....	54
7.4.3. La glicina 434 de SpPol4 es esencial en la discriminación del azúcar..	54
7.5. SpPol4 carece de actividad desoxinucleotidiltransferasa.....	55

7.6. El dominio de 8 kDa.....	55
7.6.1. Actividad desoxirribosafosfato liasa.....	56
7.6.2. <i>SpPol4</i> escinde grupos dRP a través de un mecanismo de β -eliminación.....	58
7.6.3. Análisis funcional del mutante <i>SpPol4</i> ^{R201A/K234A}	59
7.6.4. <i>SpPol4</i> carece de actividad AP liasa.....	59
II. Reparación por escisión de base.....	61
1. Reconstitución <i>in vitro</i> de la reparación por escisión de base.....	61
2. Análisis genético de mutantes de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en la ruta de reparación por escisión de base en el ADN.....	62
3. Evaluación de la actividad dRP liasa de <i>SpPol4</i> en <i>S. pombe</i>	66
4. Análisis de la mutagénesis espontánea e inducida por MMS.....	67
5. Participación de <i>SpPol4</i> en la ruta de BER de trecho largo.....	68
III. Reparación de roturas de doble cadena en el ADN.....	71
1. Capacidad de unión al ADN de <i>SpPol4</i> en ausencia de cebador y su importancia en la ruta de reparación NHEJ.....	71
2. Capacidad de <i>SpPol4</i> de aceptar y/o crear distorsiones en el ADN.....	72
2.1. Modelo de dislocación.....	72
2.2. Recolocación del cebador.....	74
3. Análisis genético de mutantes de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en la reparación de roturas de doble cadena en el ADN.....	74
3.1. Efecto de distintos agentes inductores de daño en el ADN en el mutante <i>pol4Δ</i> en un fondo carente de HR.....	75
3.1.1. Efecto del daño en el ADN causado por la HU en el mutante <i>pol4Δ</i>	77
3.2. Efecto de la radiación ionizante en la fase G1 del ciclo celular.....	79
3.3. Efecto de agentes inductores de daño en el ADN en el mutante <i>pku70Δ</i>	80
IV. Mecanismos de reparación y tolerancia al daño oxidativo en el ADN.....	83
1. Análisis genético de mutantes de <i>S. pombe</i> en la ruta de BER en respuesta a daño oxidativo.....	85
2. Análisis del mecanismo de síntesis a través de lesiones (TLS) en respuesta a la generación de 8-oxoG.....	87
3. Unión de extremos oxidados por NHEJ.....	89
DISCUSIÓN.....	91
1. Las ADN polimerasas.....	91
2. Conservación evolutiva de las ADN polimerasas de la familia X.....	91
3. Conservación estructural de las ADN polimerasas de la familia X.....	92
4. Caracterización bioquímica de <i>SpPol4</i>	95
4.1. Fidelidad de síntesis.....	95
4.2. Actividad dRP liasa.....	97
5. Posibles funciones de <i>SpPol4</i>	99
5.1. <i>SpPol4</i> y la reparación por escisión de base (BER).....	99
5.2. <i>SpPol4</i> y la reparación de roturas de doble cadena de ADN.....	101
5.3. <i>SpPol4</i> y los mecanismos de tolerancia al daño.....	102

CONCLUSIONES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXO.....	123
I. Abreviaturas.....	123
II. Glosario.....	127
AGRADECIMIENTOS.....	129

ABSTRACT

As predicted by its amino acid sequence, the purified protein coded by *Schizosaccharomyces pombe* SPAC2F7.06c is a nuclear DNA polymerase (*SpPol4*) whose biochemical properties resemble those of other X family (PolX) members. Thus, *SpPol4* is template-dependent, polymerizes in a distributive manner, lacks a detectable 3'→5' proofreading activity, and its preferred substrates are small gaps with a 5'-phosphate group. Like human Polμ, and *Saccharomyces cerevisiae* ScPol4, *SpPol4* can incorporate a ribonucleotide into a primer DNA. Like Polμ, *SpPol4* can realign the primer terminus to alternative template, but only under certain sequence contexts; therefore, it is less error-prone than Polμ. The fact that both fission and budding yeasts had only one DNA PolX suggests that they are evolutionarily closer to the stem ancestor of the family, and is also consistent with a less specialized and multipotential role in different forms of DNA repair and damage tolerance, enabled by a combination of the biochemical properties of their mammalian homologues.

Unexpectedly based on sequence analysis, *SpPol4* has dRP lyase activity like Polβ, Polλ and ScPol4, and unlike Polμ, suggesting also a role of this enzyme in base excision repair (BER). To investigate the putative role of *SpPol4* in BER, we performed an epistasis analysis by creating strains deleted of *pol4*⁺ and other genes belonging to the BER pathway, singly or in combination. The results suggest a secondary role in BER in which, *SpPol4* would act mimicking the mammalian BER pathway.

The biochemical properties of this gap-filling DNA polymerase and the presence of a BRCT domain at its N-terminus, suggest a possible role of *SpPol4* in nonhomologous end-joining (NHEJ). To investigate the putative role of *SpPol4* in NHEJ, we performed an epistasis analysis by creating strains deleted of *pol4*⁺ and other genes belonging to homologous recombination (HR) and NHEJ pathways, singly or in combination. In cells depleted of HR, *pol4*⁺-deficient cells are more sensitive to DNA double-strand breaks (DSBs) inducers like bleomycin and IR, supporting a role of *SpPol4* in the repair of DSBs, also when associated to oxidative damage. Besides, we perform an IR survival assay with nitrogen-starved cells (cells arrest in G1 phase) that suggest a role of *SpPol4* in the repair of DSBs in the G1 phase of the cell cycle.

In addition to the role of *SpPol4* in NHEJ and BER, we evaluated the participation of *SpPol4* in the mechanism of tolerance to 8-oxoguanine (8-oxoG) damage. Strikingly, whereas *S. pombe* Polη preferentially inserted dC in front of a 8-oxoG lesion, *SpPol4* preferentially inserted the wrong (dA) nucleotide. Moreover, *SpPol4* efficiently extended better 8-oxoG·dC than 8-oxoG·dA base pairs. The hypersensitivity to potassium bromate (a 8-oxoG inducer) observed in a BER-deficient background was Pol4-dependent. It is also very possible that a certain capacity to tolerate the 8-oxoG damage can be required during the NHEJ of oxidized ends. In agreement with that idea, a NHEJ mutant was shown to be hypersensitive to potassium bromate that was Pol4-dependent too. This finding suggests that *SpPol4* synthesis is mutagenic upon potassium bromate damage, in agreement with the error-prone behaviour of *SpPol4* during 8-oxoG bypass.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los organismos la información genética se encuentra contenida en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN). La totalidad de la información genética, el genoma, está constituido por todas las moléculas de ADN de una célula. Dada su importancia, el genoma debe mantener su integridad y estabilidad. Por ello, tanto el proceso de transmisión de la información genética, replicación, como la reparación del ADN son procesos fundamentales de la biología. En ambos procesos, las ADN polimerasas son las enzimas principales.

1. LAS ADN POLIMERASAS

El modelo de Watson y Crick explicaba la estructura del ADN: una doble hélice antiparalela de dos hebras complementarias. En este modelo, además vislumbraban la idea de un posible mecanismo de copia del ADN (Watson & Crick, 1953). Posteriormente en 1958, el grupo de Kornberg descubrió la ADN polimerasa I de *E. coli*, el primer ejemplo conocido de esta clase de enzimas (Lehman *et al.*, 1958). La demostración de su capacidad de catalizar la síntesis de ADN de acuerdo a las instrucciones de la cadena molde fue clave para comprender el modo en que el ADN se sintetiza en el interior de la célula y la base de numerosos estudios posteriores que comenzaron a desvelar el mecanismo de la replicación. Hasta el momento se han identificado y caracterizado numerosas enzimas de este tipo presentes en organismos muy diversos. Actualmente se conoce que las ADN polimerasas no sólo intervienen en los procesos de replicación y reparación del ADN, sino también en otros mecanismos de tolerancia al daño, recombinación y mutagénesis.

Las distintas ADN polimerasas se han clasificado en familias, basándose en la homología de secuencia primaria de aminoácidos con las primeras ADN polimerasas identificadas en *E. coli* (Ito & Braithwaite, 1991; Braithwaite & Ito, 1993). Las ADN polimerasas homólogas a la PolI de *E. coli* se han englobado en la familia A, mientras que las enzimas similares a la subunidad catalítica de la PolII de *E. coli* forman la familia B. La familia C está constituida por las ADN polimerasas homólogas a la PolIII de *E. coli*, no habiéndose encontrado ningún homólogo en eucariotas (Burgers *et al.*, 2001). La familia D está formada por una serie de ADN polimerasas presentes únicamente en arqueas (Cann & Ishino, 1999). La familia X y la familia Y engloban enzimas presentes tanto en eucariotas como en procariotas y arqueas. La familia X incluye ADN polimerasas implicadas fundamentalmente en procesos de reparación, siendo uno de sus miembros el tema central de esta Tesis doctoral. Por último, la familia Y incluye distintas ADN polimerasas capaces de replicar a través de lesiones en el ADN (Ohmori *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 2005). En la **tabla 1** se recoge los principales miembros de las diferentes familias de ADN polimerasas eucariotas.

A pesar de la diversidad existente entre las ADN polimerasas, se pueden establecer una serie de características presentes en la mayoría de enzimas de este grupo:

- ❖ Presentan un mecanismo de polimerización común. Desde el punto de vista químico, las ADN polimerasas son las enzimas responsables de catalizar el ataque nucleofílico del grupo 3' hidroxilo del desoxirribonucleósido monofosfato (dNMP) en posición 3' de la cadena que está siendo sintetizada, conocida como iniciador o cebador, sobre el fósforo α del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) que va a ser incorporado.
- ❖ Requieren de una cadena de ADN molde que dirija la síntesis de la cadena en

crecimiento según las reglas de apareamiento de bases definidas por Watson y Crick, dictando de esta forma el orden de incorporación de los dNTPs. No obstante, se han identificado ADN polimerasas con capacidad para llevar a cabo la síntesis en ausencia de molde, como es el caso de la TdT y Pol μ (Bollum, 1960; Domínguez *et al.*, 2000).

- ❖ La existencia de un extremo iniciador o cebador, que aporte un grupo 3' hidroxilo al que se pueden añadir sucesivamente los nucleótidos para originar la cadena de ADN de nueva síntesis. La molécula que actúa de cebador puede ser un segmento de cadena de ADN o ARN, o incluso, algunas ADN polimerasas utilizan el grupo hidroxilo de un aminoácido específico (Ser, Thr o Tyr) de una proteína terminal (Salas, 1991).
- ❖ Utilización de desoxirribonucleótidos para llevar a cabo la polimerización del ADN, mediante la incorporación de un residuo dNMP a la cadena cebadora, con la posterior liberación de una molécula de pirofosfato. Sin embargo, algunas ADN polimerasas son capaces de incorporar ribonucleótidos con gran eficiencia, como es el caso de dos miembros de la familia X; TdT (Boulé *et al.*, 2001) y Pol μ (Ruiz *et al.*, 2003).
- ❖ La presencia de dos iones metálicos divalentes, preferentemente Mg²⁺ (Steitz *et al.*, 1994), que actúan como cofactores de la ADN polimerasa en dicha reacción.
- ❖ La síntesis del ADN es unidireccional; las ADN polimerasas catalizan la síntesis desde el extremo 5' al extremo 3' de la cadena de ADN.
- ❖ Presentan una organización estructural común (Beard & Wilson, 2003). Todas se pliegan en forma de mano presentando tres subdominios denominados *dedos*, *palma* y *pulgar*, con la única excepción de la ADN polimerasa X del virus de la peste porcina que carece del subdominio *dedos* (Maciejewski *et al.*, 2001; Showalter *et al.*, 2001). El subdominio *palma* constituye la base de contacto con el ADN y posee los aminoácidos catalíticos. Los subdominios *dedos* y *pulgar* regulan la interacción con el ADN y el nucleótido entrante.

FAMILIA	DENOMINACIÓN GRIEGA	<i>H. sapiens</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	FUNCIÓN PROPUESTA
A	Poly (gamma)	<i>POLG</i>	<i>mip1⁺</i>	<i>MIP1</i>	Replicación y reparación del ADN mitocondrial
	Pol θ (theta)	<i>POLQ</i>	-	-	Síntesis a través de lesiones; hipermutación somática
	Polv (un)	<i>POLN</i>	-	-	Síntesis a través de lesiones
B	Pol α (alfa)	<i>POLA</i>	<i>pol1⁺</i>	<i>POL1</i>	Replicación nuclear; HR
	Pol δ (delta)	<i>POLD1</i>	<i>cdc6⁺</i>	<i>POL3</i>	Replicación nuclear; NER; MMR; HR
	Pol ϵ (epsilon)	<i>POLE</i>	<i>cdc20⁺</i>	<i>POL2</i>	Replicación nuclear; NER; BER; MMR; HR
	Pol ζ (zeta)	<i>POLZ</i>	<i>rev3⁺</i>	<i>REV3</i>	Síntesis a través de lesiones; HR
X	Pol β (beta)	<i>POLB</i>	-	-	BER
	Pol λ (lambda)	<i>POLL</i>	-	<i>POL4</i>	BER; meiosis; NHEJ; Recombinación V(D)J
	Pol μ (mu)	<i>POLM</i>	<i>pol4⁺</i>	-	Hipermutación somática; NHEJ; Recombinación V(D)J
		<i>TDT</i>	-	-	Recombinación V(D)J
Y	Pol η (eta)	<i>POLH</i>	<i>eso1⁺</i>	<i>RAD30</i>	Síntesis a través de lesiones
	Pol ι (iota)	<i>POLI</i>	-	-	Síntesis a través de lesiones
	Pol κ (kappa)	<i>POLK</i>	<i>dinB⁺</i>	-	Síntesis a través de lesiones
		<i>REV1</i>	<i>rev1⁺</i>	<i>REV1</i>	Síntesis a través de lesiones

Tabla 1. ADN polimerasas eucariotas. Las abreviaturas incluidas en la presente tabla hacen referencia a los siguientes términos: HR, recombinación homóloga; NER, reparación por escisión de nucleótido; MMR, reparación de apareamientos erróneos; BER, reparación por escisión de base; NHEJ, mecanismo de unión de extremos no homólogos.

La diversidad funcional existente entre todas las ADN polimerasas es reflejo de múltiples y, a veces, sutiles diferencias estructurales y bioquímicas. Estructuralmente, es frecuente que las ADN polimerasas presenten dominios adicionales que le pueden conferir nuevas actividades enzimáticas suplementarias a la polimerización (como la actividad exonucleasa, actividad desoxirribosafosfato liasa o actividad primasa, entre otras), o funciones no catalíticas (como dominios de interacción con otros factores protéicos o con el ADN). Bioquímicamente, las ADN polimerasas se diferencian en el número de nucleótidos que añaden a un extremo 3' hidroxilo sin disociarse del ADN (distributivas: pocos nucleótidos; procesivas: cientos a miles de nucleótidos), en la eficiencia con la que realizan la reacción de polimerización o en la preferencia de un tipo de sustrato (ADN con amplias regiones de cadena sencilla como molde, ADN con pequeños huecos, ADN con lesiones o modificaciones). Por último, una de las diferencias fundamentales es la fidelidad de síntesis de cada ADN polimerasa (Kunkel, 2004). Las polimerasas replicativas poseen una gran fidelidad de síntesis, que va acompañada de la actividad exonucleasa 3' → 5' correctora de errores. Mientras que existen otras ADN polimerasas que poseen una gran propensión a cometer errores debido a que su función en la célula así lo requiere, como es el caso de las polimerasas implicadas en los fenómenos de generación de variabilidad en el desarrollo del sistema inmunológico.

2. MANTENIMIENTO DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA

La supervivencia y la perpetuación de los seres vivos depende del mantenimiento y la conservación de su información genética. La integridad del genoma está continuamente amenazada por agentes nocivos de origen ambiental (radiación, productos químicos) y de origen endógeno (productos del propio metabolismo). La combinación de estos agentes genotóxicos junto con la inestabilidad intrínseca del ADN puede generar una alteración de la estructura química del ADN y, por consiguiente, del mensaje que codifica (Hoeijmakers, 2001). La cantidad y la diversidad de lesiones que afectan al ADN es inmensa; se ha estimado que sólo el daño endógeno genera unas 20.000 lesiones al día en una célula (Lindahl, 1993). En general, hay tres tipos de agentes causantes de daño en el ADN, los cuales originan lesiones de diferente naturaleza (**Figura 1**):

- ❖ Agentes ambientales como la luz ultravioleta (UV), la radiación ionizante (IR) y numerosos productos químicos que pueden causar alteraciones en la estructura del ADN.
- ❖ Productos generados durante el funcionamiento normal del metabolismo celular, tales como las especies de oxígeno reactivas (*Reactive Oxygen Species*, ROS), las cuales pueden producir hasta 100 modificaciones distintas en el ADN (Cadet *et al.*, 1997).
- ❖ Algunos grupos químicos del ADN pueden modificarse espontáneamente en condiciones fisiológicas. Así como la hidrólisis de los nucleótidos generando sitios abásicos o la desaminación de las bases, de forma espontánea o inducida, que puede originar cambios de nucleótidos (por ejemplo, la desaminación de la base citosina origina la base uracilo).

En células eucariotas, el daño en el ADN desencadena por un lado una respuesta al daño y por otro la reparación del mismo. Las células poseen una red de señales que les permite responder a distintos tipos de daño, activando específicamente uno o más

mecanismos de reparación, parada del ciclo celular, inhibición de la replicación y la transcripción del ADN, e incluso la muerte celular por apoptosis (Huen & Chen, 2008). Por ello, para mantener la integridad del genoma los daños deben ser eliminados. Así, los procesos de replicación y transcripción celular pueden llevarse a cabo fiel y eficientemente. Los organismos han generado diferentes mecanismos de reparación, que en general son específicos para cada tipo de daño, estando muy conservados en todos los organismos. Al menos existen cuatro vías principales de reparación del ADN: la reparación por escisión de base (*Base Excision Repair*, BER), la reparación por escisión de nucleótido (*Nucleotide Excision Repair*, NER), la reparación de apareamientos erróneos (*Mismatch Repair*, MMR) y la reparación de roturas de doble cadena en el ADN (*Double Strand Break Repair*, DSBR). Sin embargo, muchas lesiones en las bases del ADN escapan de los mecanismos de reparación y bloquean la progresión de la transcripción y la replicación. Por esta razón, los organismos han desarrollado un mecanismo de tolerancia al daño denominado síntesis a través de lesiones (*Translesion Synthesis*, TLS), en el cual actúan ADN polimerasas especializadas que añaden nucleótidos en la cadena que se está sintetizando frente a la lesión y extienden ese apareamiento permitiendo la continuidad de la replicación (Prakash *et al.*, 2005).

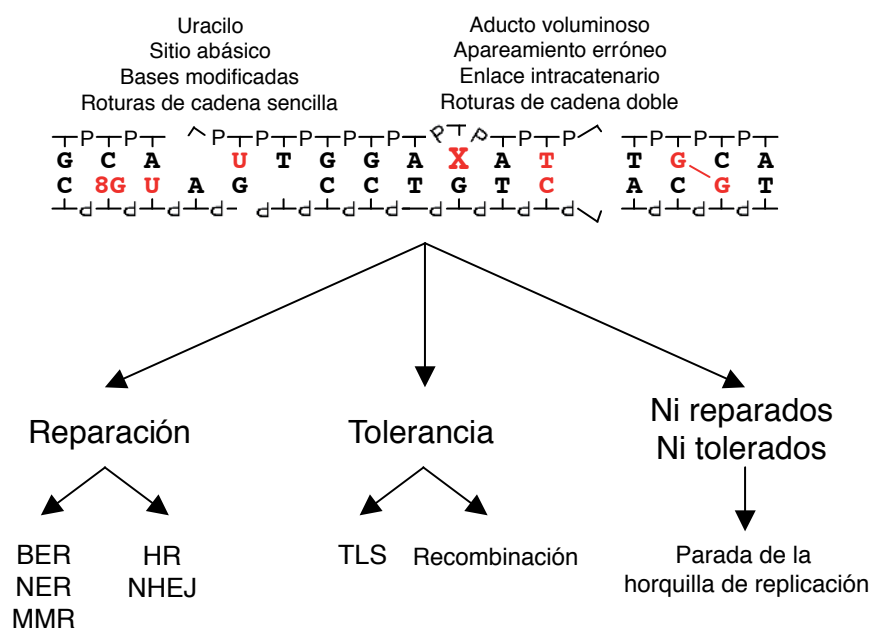


Figura 1. Tipos de lesiones causadas en el ADN por diversos agentes y los mecanismos de reparación y tolerancia al daño. Las abreviaturas incluidas en la figura hacen referencia a los siguientes términos: BER, reparación por escisión de base; NER, reparación por escisión de nucleótido; MMR, reparación de apareamientos erróneos; HR, recombinación homóloga; NHEJ, mecanismo de unión de extremos no homólogos; TLS, síntesis a través de lesiones.

3. SISTEMAS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN

3.1. Reparación por Escisión de Base (BER)

El mecanismo de reparación por escisión de base (BER) es el encargado de corregir distintas lesiones en el ADN, tales como: la presencia de bases modificadas químicamente por alquilación, oxidación o desaminación (Lindahl & Wood, 1999), la inserción de bases modificadas por una ADN polimerasa (dUTP, 8-oxodGTP) (Dianov *et al.*, 1992; Singhal *et al.*, 1995) o la pérdida espontánea de una base en el ADN

generando sitios abásicos (sitios apurínico/apirimidínico, AP) (Fortini *et al.*, 2003). Estas lesiones suponen modificaciones poco voluminosas en el ADN, no distorsionan su estructura y, por lo tanto, no suelen obstaculizar a la maquinaria de replicación ni de transcripción. Sin embargo, si no son reparadas pueden derivar en mutagénesis. Asimismo, BER está implicado en la reparación de roturas de ADN de cadena sencilla (Lindahl, 1990). El mecanismo básico de BER fue estudiado inicialmente en la bacteria *E. coli*, y posteriormente se comprobó que está muy conservado de procariotas a mamíferos.

Mediante BER, las bases dañadas son reconocidas y eliminadas específicamente por la acción de una serie de ADN glicosilasas, cuya acción genera sitios abásicos mediante la rotura del enlace N-glicosídico que une la base dañada a la desoxirribosa. A continuación una AP endonucleasa rompe el enlace fosfodiéster de la cadena de ADN en posición 5' del sitio abásico, generando un residuo 3' hidroxilo y un residuo desoxirribosa fosfato (dRP) en posición 5'. A partir de este punto existen dos estrategias, dependiendo del organismo, para eliminar el residuo nucleolítico y reemplazarlo por un nucleótido nuevo (Memisoglu & Samson, 2000a).

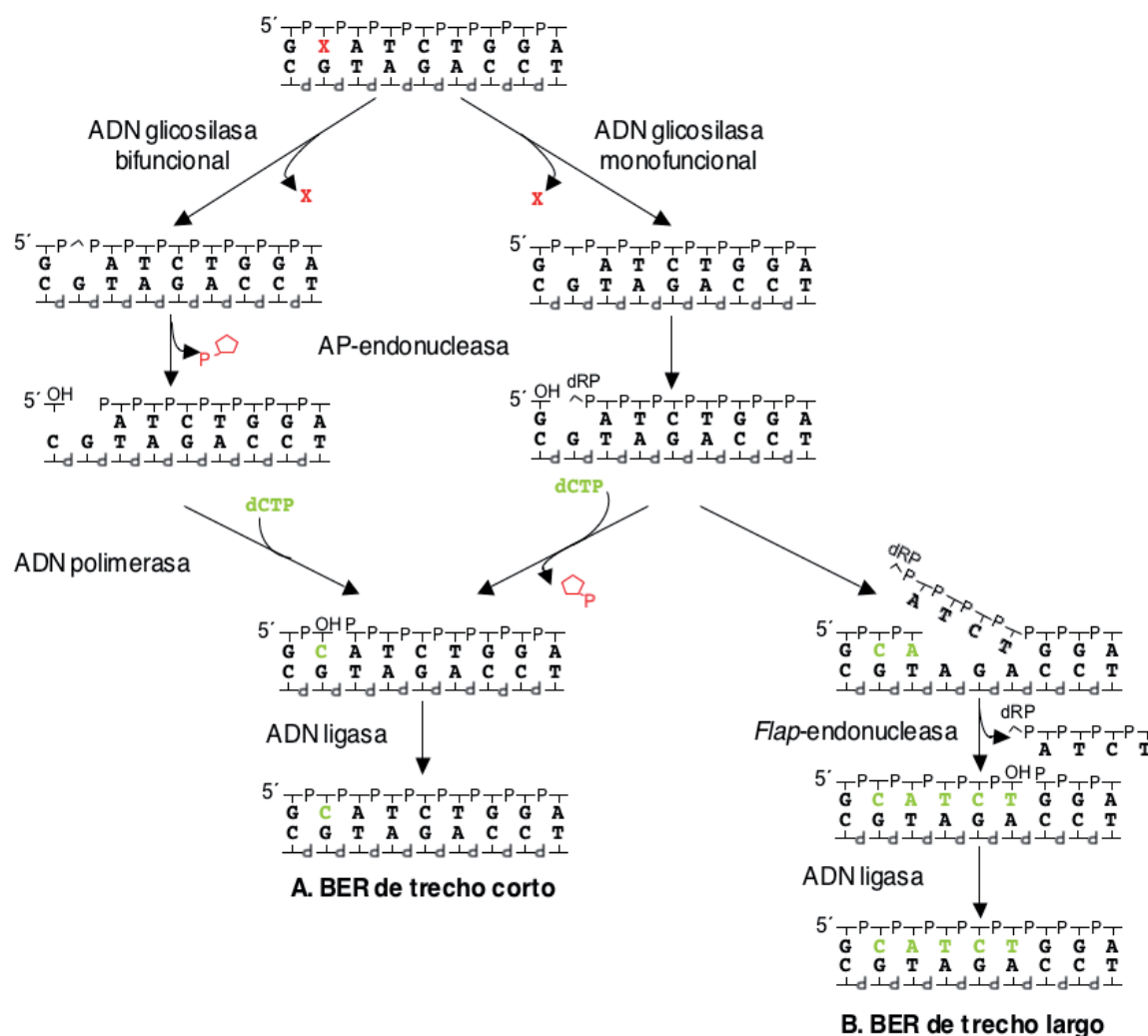


Figura 2. Mecanismo de reparación por escisión de base (BER). (A) BER de trecho largo. (B) BER de trecho corto iniciado por una ADN glicosilasa monofuncional o bifuncional. En verde se señala el ADN de nueva síntesis. Figura modificada de Fortini *et al.* (2003).

La primera estrategia, denominada BER de trecho corto, requiere una actividad desoxirribosafosfato liasa (dRP liasa) para eliminar el residuo dRP e implica la sustitución de un único nucleótido, siendo la ruta mayoritaria en células de mamífero. La actividad dRP liasa presente en el dominio de 8 kDa de Pol β genera un hueco de un nucleótido que será rellenado por la propia polimerasa (**Figura 2.A, parte derecha**). Si la glicosilasa, u otro enzima, posee también actividad AP liasa puede generarse una situación diferente: tras la retirada de la base se realiza un corte en posición 3' respecto al sitio abásico por la actividad AP liasa y la AP endonucleasa corta en posición 5' provocando la formación de un hueco de un único nucleótido. El enzima polinucleótido quinasa (PNK), gracias a sus actividades 5'ADN quinasa y 3'ADN fosfatasa, repondría el grupo hidroxilo en posición 3' y el fosfato en 5' si fuera necesario, para que posteriormente la polimerasa rellenara el hueco (**Figura 2.A, parte izquierda**). Por último, en ambos casos se necesita la acción de una ADN ligasa para sellar la unión (ADN ligasa I o el complejo formado por XRCC1/ADN Ligasa III), completándose de esta forma la reparación por escisión de base de trecho corto (**Figura 2.A**).

La segunda estrategia, denominada BER de trecho largo, implica la sustitución de entre 2 y 13 nucleótidos y, por tanto, no requiere la eliminación del residuo dRP. Si el residuo dRP está modificado (oxidado o reducido) y no puede ser eliminado por la actividad dRP liasa, una ADN polimerasa puede realizar una síntesis de 2 a 13 nucleótidos asociada a un desplazamiento de banda. Este proceso genera un ADN de cadena sencilla de longitud equivalente que será cortado por la endonucleasa FEN-1 (*flap endonuclease 1*), generando un sustrato para la ADN ligasa (**Figura 2.B**). Las ADN polimerasas Pol β , Pol δ y Pol ϵ realizan esta síntesis para la cual necesitan proteínas accesorias como el antígeno nuclear de células en proliferación (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, PCNA) y el factor de replicación C (*Replication Factor C*, RFC). Esta es la ruta utilizada mayoritariamente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Por último, se ha descrito una ruta alternativa, independiente de ADN glicosilasas, denominada reparación por incisión de nucleótido (*Nucleotide Incision Repair*, NIR) (Ischenko & Sapparbaev, 2002). Modificaciones procedentes de la radiación γ o del daño oxidativo son sustrato de las AP endonucleasas, las cuales rompen el enlace fosfodiéster de la cadena de ADN en posición 5' de la base dañada. La reparación continúa utilizando la maquinaria del BER de trecho largo (Ishchenko *et al.*, 2003; Ishchenko *et al.*, 2004; Daviet *et al.*, 2007).

Por otro lado, diversos estudios han propuesto la participación de otras ADN polimerasas en BER cuando Pol β esté ausente o para reparar cierto tipos de daño oxidativo. Una de ellas es otro miembro de las ADN polimerasas de la familia X, Pol λ , que al igual que Pol β presenta actividad dRP liasa y la misma preferencia por sustratos de ADN con pequeños huecos y un grupo 5' fosfato (García-Díaz *et al.*, 2000; García-Díaz *et al.*, 2001). Además de una ADN polimerasa de la familia Y, Pol ι , que también presenta actividad dRP liasa, por lo que podría participar en mecanismos de BER más especializados (Bebenek *et al.*, 2001). Pol γ también presenta actividad dRP liasa, siendo además la única ADN polimerasa presente en la mitocondria (Longley *et al.*, 1998). Por esta razón Pol γ sería la responsable de toda la síntesis del ADN de este orgánulo, incluyendo los procesos de reparación del daño en el ADN.

3.1.1. Pol β : un modelo de ADN polimerasa de reparación

La Pol β es considerada el paradigma de la familia X, debido a que es una de las ADN polimerasas mejor caracterizadas hasta la fecha. Se trata de una enzima de pequeño tamaño (39 kDa), que no necesita proteínas accesorias para realizar su actividad. Existe una gran cantidad de datos estructurales y bioquímicos que han permitido asociar a esta polimerasa con una gran cantidad de procesos (Beard & Wilson, 2000).

❖ Características enzimáticas

La Pol β es una nucleotidiltransferasa dependiente de molde que sigue un mecanismo cinético similar al de la mayoría de las ADN polimerasas, la cual requiere dos iones metálicos (Steitz, 1999). Se trata de una enzima que se comporta de modo distributivo en moléculas tipo molde/cebador (Abbotts *et al.*, 1988; Werneburg *et al.*, 1996) pero que, por el contrario, polimeriza de modo procesivo en una molécula con huecos de pocos nucleótidos en las que haya un grupo fosfato en el extremo 5' del hueco (Singhal & Wilson, 1993), siendo éste el sustrato idóneo ya que la Pol β ve aumentada su actividad (Chagovetz *et al.*, 1997; Ahn *et al.*, 1998).

Una de las principales características de Pol β que la diferencia de las polimerasas replicativas es que carece de actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5' correctora de errores, lo cual repercute en una disminución de la fidelidad durante la síntesis de ADN. Estudios *in vitro* muestran que es una ADN polimerasa con tendencia al error, con una frecuencia de errores de sustitución de base de 10^{-3} - 10^{-4} (Kunkel, 1985; Ahn *et al.*, 1997; Osheroff *et al.*, 1999). Por otro lado, su modo de acción distributiva favorece la propensión a cometer errores de delección mediados por deslizamiento (Kunkel, 1985; Werneburg *et al.*, 1996; Osheroff *et al.*, 1999), efecto que aumenta si la base molde posee algún tipo de lesión (Efrati *et al.*, 1997; Hashim *et al.*, 1997). En su sustrato idóneo, moléculas con huecos de pocos nucleótidos, la fidelidad de síntesis de Pol β alcanza su nivel óptimo (Chagovetz *et al.*, 1997; Osheroff *et al.*, 1999). Asimismo, la fidelidad de Pol β *in vivo* podría aumentar gracias a proteínas accesorias con actividad 3' \rightarrow 5' exonucleasa que corrigiesen los eventuales errores cometidos por Pol β (Shevelev & Hübscher, 2002).

❖ Organización estructural

La Pol β fue la primera ADN polimerasa eucariota de la que se dispuso una estructura cristalina de alta resolución. Está compuesta por dos dominios estructurales diferentes. En su extremo C-terminal se encuentra el dominio de polimerización (31 kDa), formado a su vez por los subdominios *dedos*, *palma* y *pulgar*, donde reside su actividad polimerasa. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de 8 kDa, característica que diferencia a la Pol β de otras ADN polimerasas y que determina su papel en la célula, ya que es donde reside su actividad dRP liasa, actividad fundamental para el mecanismo de BER. Ambos dominios se encuentran conectados por una región sensible a proteasas (Prasad *et al.*, 1998a).

La resolución de la estructura cristalográfica de Pol β como apoenzima (Davies *et al.*, 1994; Sawaya *et al.*, 1994) y formando un complejo con diferentes sustratos de ADN y nucleótido entrante (Pelletier *et al.*, 1994; Pelletier *et al.*, 1996; Sawaya *et al.*, 1997) ha permitido dilucidar los detalles del mecanismo de polimerización de Pol β .

En ausencia de ADN o en presencia de un ADN tipo molde/cebador, Pol β se encuentra en una conformación en la que el dominio de 8 kDa se sitúa alejado del

dominio de polimerización y no interacciona con el ADN (**Figura 3.A**) (Pelletier *et al.*, 1994; Sawaya *et al.*, 1994). En presencia de un ADN con un hueco de un nucleótido, el dominio de 8kDa se pliega uniendo la zona final del hueco, concretamente el grupo fosfato en posición 5' del hueco (**Figura 3.B**) (Sawaya *et al.*, 1997; Beard & Wilson, 1998). De esta forma se produce una interacción entre el extremo C-terminal del dominio de 8 kDa y el subdominio *pulgar* del dominio de polimerización, afianzando la unión al ADN. La formación del complejo ternario por la unión del nucleótido provoca que el subdominio *pulgar* sufra un cambio conformacional encaminado a establecer las interacciones necesarias para la catálisis enzimática, dando lugar a un complejo "cerrado" (**Figura 3.C**) (Sawaya *et al.*, 1997), que influye además decisivamente en el nivel de fidelidad de la reacción (Beard & Wilson, 2000; Kunkel & Bebenek, 2000; Kunkel, 2004). Además, el subdominio *dedos* a través de un motivo *hélice-horquilla-hélice* interacciona con el cebador contribuyendo al cierre del sitio de unión del nucleótido (**Figura 3.C**) (Doherty *et al.*, 1996). Tras el evento de catálisis, el subdominio *pulgar* vuelve a su posición inicial (complejo "abierto") facilitando la difusión del pirofosfato y la traslocación o disociación del ADN según el caso (Pelletier *et al.*, 1996).

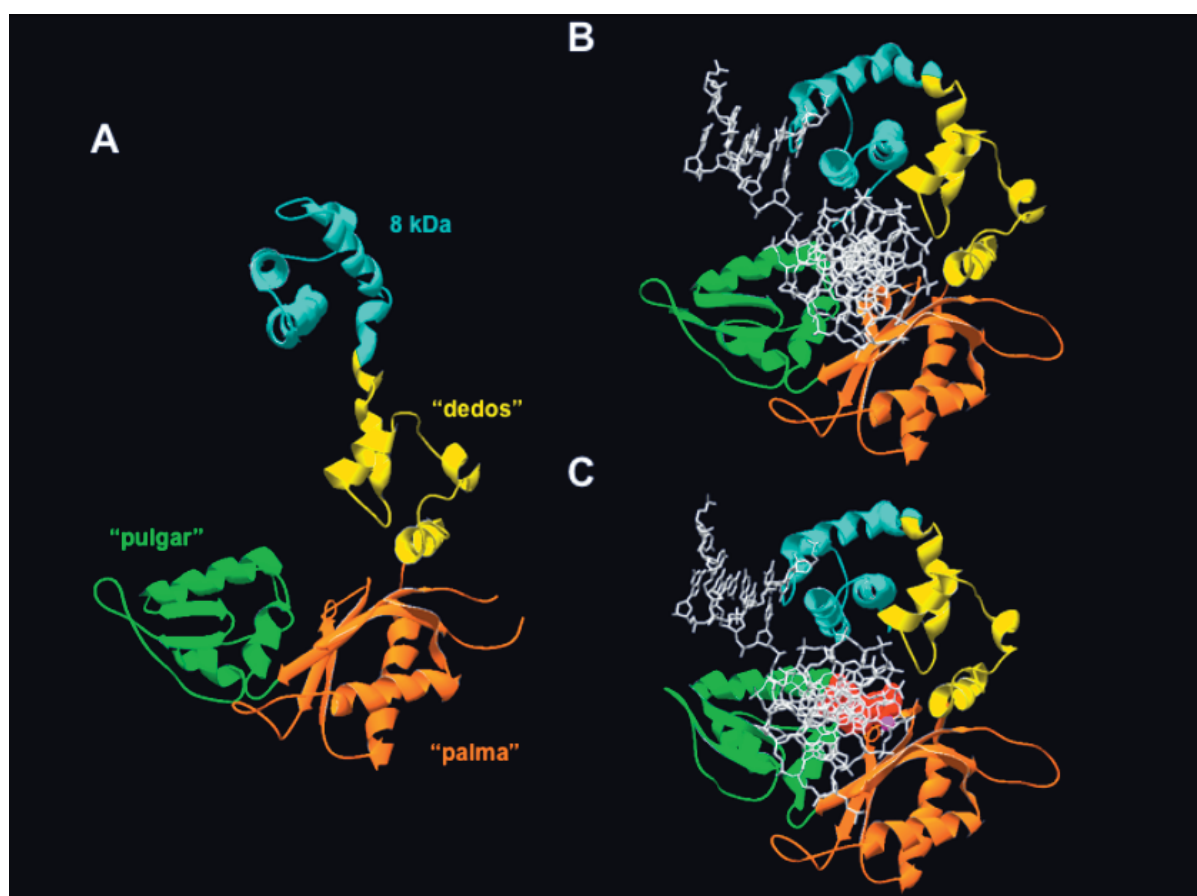


Figura 3. Estructura tridimensional de Polβ. La disponibilidad de diferentes cristales de Polβ ha permitido comprender la dinámica de la reacción de polimerización. **(A) Apoenzima.** En ausencia de ADN el dominio de 8 kDa (azul) se dispone alejado del dominio de polimerización, formado por los subdominios dedos (amarillo), palma (naranja) y pulgar (verde). **(B) Complejo binario.** La unión de un ADN con un hueco provoca el cierre del dominio de 8 kDa, que lleva a cabo la unión de la zona final del hueco, concretamente el grupo fosfato en 5'. **(C) Complejo ternario.** La unión del nucleótido entrante (rojo) provoca cambios conformacionales en los subdominios *pulgar* y *dedos*, dando lugar a un complejo "cerrado" necesario para la catálisis enzimática. Los iones magnesio necesarios para coordinar la entrada del nucleótido y para la catálisis se representan en magenta. La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex *et al.*, 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas corresponden a los archivos 1BPD (A), 1BPX (B) y 1BPY (C), de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

❖ El dominio de 8 kDa

Este dominio situado en el extremo N-terminal de la Pol β posee asociadas diversas actividades y funciones. En primer lugar, en él se sitúa el centro activo de la actividad dRP liasa, encargada de eliminar el residuo dRP generado durante el mecanismo de reparación BER (Matsumoto & Kim, 1995). Esta actividad se produce gracias a un mecanismo de β -eliminación a través de un intermediario en forma de base de Schiff y de manera independiente de metal (Prasad *et al.*, 1998b), a diferencia de la mayoría de las nucleasas, que utilizan un mecanismo asistido por metal. Se ha postulado que en este dominio reside otra actividad endonucleolítica denominada AP liasa que produce la incisión de la cadena de ADN en posición 3' del sitio abásico. Cabe destacar que esta actividad es 200 veces menos eficiente que la actividad dRP liasa (Prasad *et al.*, 1998b). Por otro lado, el dominio de 8 kDa también presenta una función de unión a ADN. Posee una superficie de unión a ADN de cadena sencilla (Kumar *et al.*, 1990) a través de un motivo *hélice-horquilla-hélice* (Doherty *et al.*, 1996) y un sitio de unión para grupos fosfato situados en posición 5' de un hueco en el ADN (Prasad *et al.*, 1994). Ambas propiedades son cruciales para que la Pol β lleve a cabo sus funciones *in vivo*. El dominio de 8 kDa también ha sido objeto de estudio desde el punto de vista de la regulación de su actividad mediante modificación postraducciona. Se ha demostrado la acetilación de residuos de este dominio a través de la interacción específica entre la Pol β y el coactivador transcripcional p300, lo que provoca la reducción de la actividad dRP liasa, mientras que las actividades polimerasa y AP liasa no se ven afectadas (Hasan *et al.*, 2002).

❖ Otras funciones

Aparte de su papel principal en el mecanismo de BER, Pol β ha sido también implicada en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (Horton *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 1996; Canitrot *et al.*, 2000), en reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (Wilson & Lieber, 1999), en replicación (Jenkins *et al.*, 1992; Sweasy & Loeb, 1992; Sweasy *et al.*, 1995), en recombinación (Nowak *et al.*, 1990), en meiosis (Plug *et al.*, 1997) y en fenómenos de neurogénesis, ya que los ratones carentes de Pol β mueren al poco tiempo de nacer y muestran altos niveles de muerte celular por apoptosis en neuronas postmitóticas del sistema nervioso central y periférico en desarrollo (Sugo *et al.*, 2000).

3.2. Reparación por Escisión de Nucleótido (NER)

El mecanismo de escisión de nucleótido (NER) opera esencialmente sobre daños voluminosos, los cuales distorsionan la doble hélice de ADN obstruyendo el desarrollo normal de los procesos de replicación y transcripción del ADN. Se han establecido dos subtipos de NER en función del sustrato sobre el que actúa: uno de ellos se activa cuando la lesión aparece en cualquier parte del genoma (*Global Genome NER*, GG-NER) y el otro actúa sobre las que bloquean la actividad de la ARN polimerasa durante la transcripción del ADN, de ahí su denominación como reparación asociada a la transcripción (*Transcription-Coupled Repair*, TCR). Al activarse por diferentes situaciones, la diferencia entre ambos mecanismos radica básicamente en los complejos proteicos que reconocen las lesiones (de Laat *et al.*, 1999). Una vez reconocidas estas, el proceso de reparación es común para los dos; la doble hélice de ADN dañada es abierta por una serie de helicasas que forman parte del complejo TFIIH (concretamente XPB y XPD). La burbuja generada, de unos 30 pares de bases alrededor de la lesión, es

reconocida por una proteína de unión a ADN de cadena sencilla, la proteína replicativa A (*Replication Protein A*, RPA), que se une específicamente a la hebra no dañada. Así, la hebra dañada puede ser reconocida por las endonucleasas XPG y ERCC1/XPF, que producen cortes a uno y otro lado de la lesión, eliminándose un fragmento de ADN de cadena sencilla de entre 24-32 bases, entre las cuáles está la base dañada. Finalmente, el espacio generado es rellenado con elevada fidelidad por la maquinaria de replicación.

3.3. Reparación de Apareamientos Erróneos (MMR)

Mediante el mecanismo de reparación de apareamientos erróneos (MMR) se eliminan los nucleótidos incorporados incorrectamente por las ADN polimerasas y los fragmentos nucleotídicos que se producen en ocasiones como consecuencia del deslizamiento de éstas cuando replican secuencias de ADN repetitivas o durante la recombinación. Este mecanismo es esencial para evitar la mutagénesis en el ADN, y en él participan numerosas actividades enzimáticas, incluyendo algunas de las que participan en NER (Schofield & Hsieh, 2003). El proceso de reparación comienza con el reconocimiento de la lesión por los complejos proteicos heterodiméricos Msh2/6 o Msh2/3 (dependiendo de que se trate de un apareamiento erróneo puntual o de varios nucleótidos). Una vez localizado el daño, son reclutados los complejos proteicos Mlh1/Pms2 y Mlh1/Pms1, que interaccionan a su vez con factores replicativos. Estos últimos contactos son los que indican al sistema cuál es la hebra de ADN que tiene que repararse: la recién sintetizada. En el proceso de escisión de los nucleótidos hasta eliminar el apareamiento erróneo y posterior resíntesis de ADN participan muchas proteínas, incluyendo las ADN polimerasas Pol δ y Pol ϵ , RPA, PCNA o la endonucleasa FEN-1 (Schofield & Hsieh, 2003).

3.4. Reparación de Roturas de Doble Cadena en el ADN

Las roturas de doble cadena en el ADN (*Double Strand Break*, DSB) son especialmente dañinas para la célula. Estas roturas pueden dar lugar a la pérdida de la información genética y muerte celular, o a reordenamientos cromosómicos (translocaciones, inversiones, deleciones) que pueden derivar en carcinogénesis (Mills *et al.*, 2003). Las roturas de doble cadena en el ADN pueden generarse de manera fisiológica durante la replicación y meiosis (Shinohara & Ogawa, 1995; Michel *et al.*, 1997). Se estima que las células humanas sufren aproximadamente 10 DSB por ciclo celular de forma espontánea, la mayoría de las cuales ocurre durante la replicación, cuando la horquilla de replicación se encuentra con una rotura de cadena simple (*Single Strand Break*, SSB) (Paques & Haber, 1999). Asimismo, este tipo de roturas son provocadas por la acción de agentes químicos endógenos, procedentes del metabolismo celular (Karanjawala *et al.*, 2002), o por la acción de agentes exógenos, como la radiación ionizante (Morgan *et al.*, 1996; Ward, 2000). En respuesta a este tipo de daño los organismos promueven la reparación eficiente del daño para restaurar la integridad y funcionalidad del genoma.

Existen dos mecanismos principales de reparación de DSB: la recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR) y unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End-Joining*, NHEJ). La recombinación homóloga se encarga de reparar el daño recuperando la información genética de la cromátida hermana o del cromosoma homólogo; es una reparación libre de error. Por otro lado, la reparación por NHEJ se encarga de ligar los extremos utilizando poca o ninguna homología entre ellos; siendo

un mecanismo mutagénico. En células de mamíferos, el mecanismo predominante para la reparación de DSB es NHEJ, el cual funciona a lo largo de todo el ciclo celular. Mientras que la HR tiene lugar durante la fase S tardía o G2, cuando la cromátida hermana está próxima y en competición con el mecanismo de NHEJ (Lieber, 2008). Por el contrario, en levaduras la HR es la que mayoritariamente se encarga de la reparación de DSB, probablemente debido a que es una reparación libre de error. En estos organismos modelo, las dos rutas mayoritarias de reparación de DSB (HR y NHEJ) están recíprocamente reguladas a lo largo del ciclo celular. De esta manera, en la fase G1 del ciclo los niveles de reparación por NHEJ son mayores que la reparación por HR, mientras que en la fase G2 del ciclo celular sucede lo contrario, la reparación por HR es la predominante (Aylon *et al.*, 2004; Ferreira & Cooper, 2004; Ira *et al.*, 2004; Sonoda *et al.*, 2006). Cabe resaltar que ambos mecanismos, HR y NHEJ, tanto en levaduras como en eucariotas superiores, actúan de forma competitiva pero también cooperativa (Shrivastav *et al.*, 2008).

Los mecanismos de reparación de DSB están muy conservados a lo largo de la evolución desde bacterias a mamíferos. Las levaduras son un modelo ideal para su estudio en eucariotas, ya que los datos obtenidos son aplicables a organismos eucariotas superiores.

3.4.1. Mecanismos de Recombinación Homóloga (HR)

Tanto levaduras como mamíferos poseen varios mecanismos de HR para reparar DSB. Existen al menos tres: la conversión génica (*Gene Conversion*, GC), la recombinación inducida por rotura (*Break-Induced Replication*, BIR) y el alineamiento de cadena sencilla (*Single-Strand Annealing*, SSA).

Los distintos mecanismos de HR se han estudiado ampliamente en *S. cerevisiae*. Se requiere una homología de entre 50-100 pares de bases entre la secuencia a reparar y el molde no dañado. Son mecanismos precisos que requieren las proteínas del grupo epistático de Rad52, (Rad51, Rad52, Rad54/Rad55, Rad57, Rad59, Rdh54 y las proteínas que forman el complejo MRX: Mre11, Rad50 y Xrs2), RPA y la ligasa Cdc9. De todas las proteínas implicadas en el proceso de HR, sólo Rad52 se requiere para todos los acontecimientos en *S. cerevisiae*. Se han encontrado proteínas homólogas del grupo epistático de Rad52 en la mayoría de los organismos eucariotas, incluso en bacterias y arqueas, lo que indica una alta conservación de este mecanismo de reparación (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

La reparación de DSB por HR requiere del procesamiento de los extremos de ADN por una 5'→3' exonucleasa que elimina los nucleótidos en dirección 5'→3' a partir del extremo. De esta forma se generan fragmentos grandes de ADN de cadena sencilla con un extremo 3' al que se unen diversas proteínas dando lugar a un filamento núcleo-proteico. RPA se encarga de eliminar las estructuras secundarias del ADN permitiendo la formación del filamento núcleo-proteico de Rad51. Rad52 interacciona directamente con RPA y Rad51, siendo la proteína encargada de desplazar a RPA para permitir la unión de Rad51 al ADN de cadena sencilla, convirtiéndose Rad52 en una proteína esencial en el proceso. Otras proteínas como Rad55 y Rad57 también participan en la formación del filamento. El filamento núcleo-proteico de Rad51 es capaz de interactuar con una segunda molécula de ADN, tanto de cadena doble como sencilla, promoviendo la invasión de la cromátida hermana. Con la ayuda de Rad54, el filamento núcleo-proteico de Rad51 genera una remodelación en la cromatina, desenrollando el ADN

y permitiendo el intercambio con el ADN homólogo. Posteriormente, Rad54 ayuda al desplazamiento de Rad51.

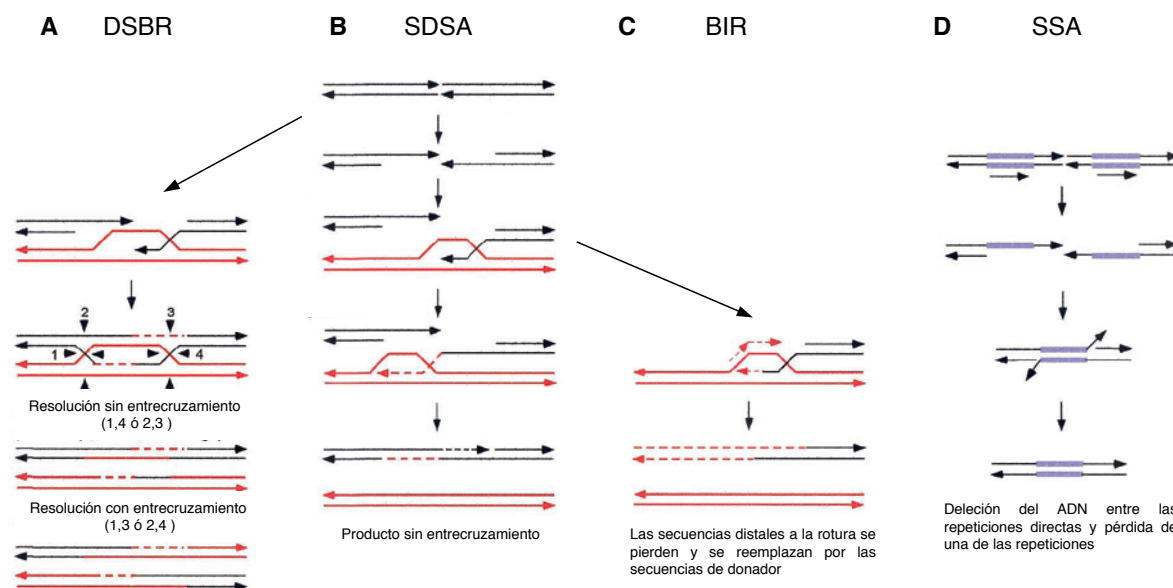


Figura 4. Modelos de reparación de DSB por HR. (A) DSBR. Dependiendo de la resolución del intermedio de Holliday, se generan productos con y sin entrecruzamiento. (B) SDSA. Este modelo sólo origina productos sin entrecruzamiento. (C) BIR. El paso inicial de este modelo es el mismo que en el modelo SDSA, pero la síntesis del ADN de la cadena que invade se produce hasta el final de la molécula. (D) SSA. En este modelo se produce la delección de una de las repeticiones y la región entre ambas. Modificado de Symington (2002).

❖ Conversión génica (GC)

La conversión génica se define como una transferencia de información genética no recíproca de una molécula a su homóloga. Normalmente ocurre entre dos alelos de un gen. Este mecanismo a su vez se subdivide en la reparación de roturas de doble cadena (*Double Strand Break Repair*, DSBR) y la síntesis dependiente del alineamiento de cadena (*Síntesis Dependiente Strand Annealing*, SDSA). Se diferencian en si los productos obtenidos presentan entrecruzamiento o no (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

En ambos casos la invasión de la cadena se produce de la misma manera (**Figura 4.A y B**). Una vez generada la DSB, los extremos de la misma se procesan eliminando nucleótidos en dirección 5'→3' a partir del extremo. Por tanto, se crean grandes fragmentos de cadena sencilla que invaden la secuencia homóloga y, tras desplazar una de las hebras se forma un heterodúplex de ADN en aquella región que sea complementaria dando lugar a un lazo D (*Displacement loop*, D-loop). A continuación, se produce la síntesis de ADN en el heterodúplex a partir del extremo 3' del sitio original de rotura. La cromátida hermana proporciona un molde para que tenga lugar la reparación libre de error. En el modelo DSBR, se forma una estructura con forma de X denominada unión de Holliday (*Holliday junction*, HJ), resultado de la invasión y posterior entrecruzamiento de las cromátidas hermanas; el D-loop formado se liga con el otro lado de la DSB y, el extremo 3' de la cadena que no invade se extiende mediante síntesis de ADN originando lo que se conoce como intermedio de Holliday (dHJ). Su resolución origina igualmente productos entrecruzados o productos no entrecruzados. Por el contrario, en el modelo SDSA después de la síntesis de ADN en la

cadena elongada, ésta se desplaza a su posición original apareando con la cadena que no invade y por tanto, sirviendo de molde para restituir la secuencia perdida. Como resultado se originan productos no entrecruzados (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

❖ Recombinación inducida por rotura (BIR)

La conversión génica se produce normalmente en regiones cortas de ADN, pero se han encontrado eventos de conversión génica en los que están involucradas zonas más amplias de ADN. En el modelo BIR (**Figura 4.C**), después de la invasión de la cadena con el extremo 3', no hay una estabilización de la cadena desplazada mediante el alineamiento con el otro extremo de la rotura. La síntesis de ADN continúa hasta el final de la molécula. En consecuencia, las secuencias distales de la rotura se pierden, siendo reemplazadas por la secuencia de la cadena donadora. Este proceso de intercambio no recíproco de material genético se conoce por ser importante en el mantenimiento de los telómeros en ausencia de telomerasa (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

❖ Alineamiento de cadena sencilla (SSA)

Este mecanismo tiene lugar cuando las DSB se producen entre repeticiones directas (**Figura 4.D**). Después de la rotura, si la formación de la cadena sencilla es lo suficientemente extensa para llegar a las regiones complementarias que flanquean la DSB, éstas pueden ser alineadas. Las colas de cadena sencilla sobrantes son eliminadas por la acción de las endonucleasas Rad1/Rad10 y los huecos son rellenados por ADN polimerasas para posteriormente ser ligados. Este proceso produce la delección de una de las regiones repetidas y la región de ADN existente entre ambas repeticiones, por lo que está considerado como un mecanismo mutagénico (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

3.4.2. Mecanismo de Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ)

El mecanismo de NHEJ reconoce los extremos de una rotura de doble cadena y, basándose en secuencias complementarias de pocos nucleótidos (1-4 nt, o incluso en ausencia total de complementariedad), restaura la integridad del ADN con escasas modificaciones en la secuencia. Esas modificaciones son producto del procesamiento necesario de los extremos por parte de la maquinaria de NHEJ para poder unir y sellar los extremos (Hefferin & Tomkinson, 2005; Ma *et al.*, 2005; Lieber, 2008).

El primer paso de la ruta NHEJ es la sinapsis de los extremos de la rotura de doble cadena. El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce los extremos de la rotura, y gracias a su estructura toroidal acomoda el dúplex de ADN en su interior, previniendo la posible degradación nucleolítica (Walker *et al.*, 2001). A continuación, la quinasa ADN-PK se recluta (Dvir *et al.*, 1992; Gottlieb & Jackson, 1993), desplazando ligeramente al heterodímero Ku (Dyran & Yoo, 1998), y permitiendo que ambos extremos se acerquen gracias a interacciones proteína-proteína específicas (Yaneva *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; DeFazio *et al.*, 2002). El complejo ADN-PK formado recluta a su vez a las proteínas necesarias para un posible procesamiento y posterior ligación de los extremos. Artemis, una exonucleasa 3'→5' de cadena sencilla, se activa mediante fosforilación por ADN-PK mostrando también actividad endonucleasa en extremos tanto 3' como 5' protuberantes (Ma *et al.*, 2002). La polinucleótido quinasa PNK,

que posee actividad 5'ADN quinasa y 3'ADN fosfatasa (Karimi-Busheri *et al.*, 1999), se encarga de procesar los extremos (Chappell *et al.*, 2002). Tras el procesamiento y alineamiento de las cadenas de ADN, es factible la aparición de huecos de pocos nucleótidos que tendrán que ser rellenados como paso previo a la ligación. En este proceso se ha implicado a la ADN polimerasa de la familia X Pol μ (Mahajan *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2004). Asimismo, Pol μ podría realizar una polimerización independiente de molde para promover la aparición de secuencias complementarias necesarias para el alineamiento (Ma *et al.*, 2004; Juárez *et al.*, 2006). Por último, el complejo formado por XRCC4/ADN ligasa IV sella la unión entre los extremos de la rotura (Grawunder *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000) (Figura 5).

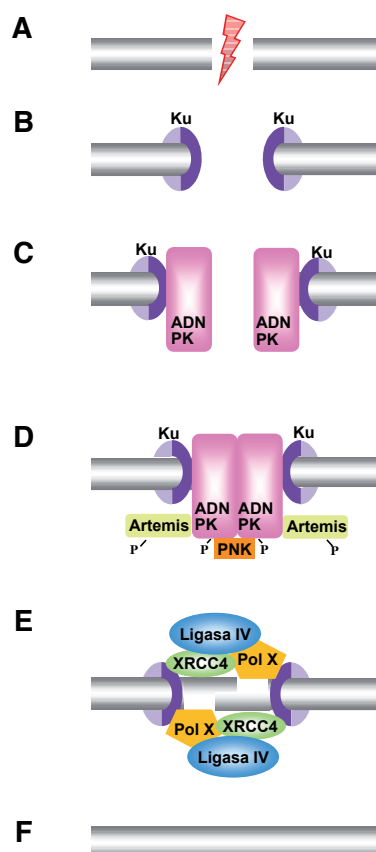


Figura 5. Mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Este sistema de reparación se encarga de reparar roturas de doble cadena que se generan en el ADN como consecuencia de un daño. **(A)** El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce y se une a los extremos de la rotura. **(B)** A continuación se une la quinasa dependiente de ADN ADN-PK. **(C)** que recluta y activa por fosforilación a la nucleasa Artemis y a PNK **(D)**, los cuales se encargan de procesar los extremos. Posteriormente se alinean los extremos, se rellenan los huecos generados **(E)** y se sella la rotura **(F)**, proceso en el que intervienen ADN polimerasas de la familia X, XRCC4 y ADN ligasa IV.

Recientemente, se ha identificado en mamíferos un factor similar a la proteína XRCC4 denominado XLF (*XRCC4-like factor*) o Cernunnos, el cual interacciona con el complejo XRCC4/ADN ligasa IV promoviendo la ligación de los extremos (Ahnesorg *et al.*, 2006; Hentges *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae*, el proceso de NHEJ requiere las proteínas Ku70/Ku80, el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), la ADN ligasa 4 (Dnl4), XRCC4 (Lif1), Nej1 (homólogo de XLF) y ScPol4. Curiosamente no se han identificado homólogos de ADN-PK y Artemis (Daley *et al.*, 2005). Mientras que en *S. pombe*, este proceso únicamente requiere las proteínas Ku70/Ku80, Xlf1 y la ADN ligasa 4. Sorprendentemente, *S. pombe* no presenta homólogos de XRCC4, ni de ADN-PK y Artemis (Manolis *et al.*, 2001; Prudden *et al.*, 2003; Hentges *et al.*, 2006; Cavero *et al.*, 2007). Estos datos sugieren que el núcleo fundamental de proteínas para el mecanismo de NHEJ en todos los organismos es Ku70/Ku80 y la ADN ligasa IV, mientras que hay organismos que requieren de otros factores adicionales como la ADN-PK, Artemis, XRCC4/Lif1 y el complejo MRN/MRX.

❖ Unión de extremos mediante microhomología (MMEJ)

Existe una vía alternativa de reparación de DSB denominado unión de extremos mediante microhomología (*Microhomology-Mediated End-Joining*, MMEJ), siendo un mecanismo de unión de extremos independiente de proteínas Ku. MMEJ requiere una longitud de la microhomología de 5 a 25 nucleótidos. En *S. cerevisiae* se requiere del complejo MRX y es parcialmente dependiente de la ADN ligasa 4. De forma análoga a SSA, en MMEJ intervienen las endonucleasas Rad1/Rad10. El resultado de este mecanismo es mutagénico ya que produce deleciones frecuentemente asociadas con translocaciones cromosómicas. En células de mamífero, MMEJ se ha observado como una alternativa al NHEJ. Sin embargo, parece más eficiente en levaduras, siendo importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica a pesar de ser un mutagénico (McVey & Lee, 2008).

4. MECANISMOS DE TOLERANCIA AL DAÑO EN EL ADN

Los sistemas de reparación no son infalibles. Este hecho sumado a la posibilidad de que se produzcan diferentes lesiones en el ADN durante la fase S del ciclo celular que no puedan ser reparadas antes de que se encuentren con la maquinaria de replicación, hace necesaria la existencia de mecanismos que permitan resolver el bloqueo de la horquilla de replicación producido por lesiones no reparadas que modifican la geometría normal de la doble cadena (sitios sin base nitrogenada o abásicos, enlaces covalentes entre bases contiguas, etc.). Estas alteraciones provocan la parada de las ADN polimerasas replicativas, Pol δ y Pol ϵ , debido al requerimiento estricto por parte de estas enzimas de una geometría correcta en el apareamiento de las bases para ejercer su acción de forma eficiente y fiel. Para superar la barrera que supondrían este tipo de lesiones, la célula posee una serie de ADN polimerasas que son capaces de sintetizar ADN teniendo como molde diferentes tipos de lesiones, evitando así el bloqueo de la replicación, pero necesitando a su vez de posteriores fenómenos de reparación para resolver dichas lesiones. Por tanto, no se trata de enzimas de reparación, sino de enzimas de tolerancia al daño, ya que permiten la supervivencia celular en presencia de daño en el ADN, que de otra manera produciría la muerte celular por parada de la maquinaria de replicación. Estas polimerasas se agrupan en la familia Y, a excepción de Pol ζ que pertenece a la familia B y que participa también en estos procesos.

Los miembros de la familia Y poseen una serie de características comunes: su modo de síntesis es distributivo, poseen una baja eficiencia catalítica y una baja fidelidad de inserción de nucleótido al sintetizar ADN frente a un molde no dañado (Kunkel, 2004). Su baja fidelidad se debe a dos motivos: la ausencia de actividad exonucleasa 3'→5' y la conformación relajada de su centro activo, que les permite tener una baja selectividad por nucleótido. Asimismo, el centro activo de estas enzimas permite acomodar lesiones debido al reducido tamaño de sus subdominios *dedos* y *pulgar*, así como a la ausencia de largas cadenas laterales cargadas que permitieran discriminar entre un ADN dañado y no dañado (Yang, 2005).

Las ADN polimerasas de esta familia son: Pol η , Pol ι , Pol κ y REV1 (Prakash *et al.*, 2005). Algunas lesiones en el ADN pueden únicamente requerir una polimerasa que inserte un nucleótido frente a la lesión y que además lleve a cabo la extensión del par generado. Sin embargo, otras lesiones pueden necesitar dos polimerasas diferentes, cada una especializada en uno de los pasos. De igual forma, cada polimerasa parece ser específica de uno o varios tipos de lesiones concretas, lo cual vendría dado por

especificidades estructurales entre los miembros de esta familia.

Todos los miembros de la familia Y interaccionan con PCNA, lo que ha dado lugar a diferentes modelos para explicar el posible tráfico de proteínas (Pagès & Fuchs, 2002) y su regulación postraducciona mediante ubiquitinación y sumoilación (Hoege *et al.*, 2002; Ulrich, 2004).

5. *Schizosaccharomyces pombe*: MODELO DE ORGANISMO EUCARIOTA

La especie *Schizosaccharomyces pombe* fue la primera levadura de fisión descubierta en 1893 por P. Lindner, definiéndose como un organismo unicelular perteneciente al filo *Archaeascomycete*. Las levaduras de fisión se caracterizan porque siguen un patrón simétrico de división celular (de ahí el prefijo *Schizo*-). A mediados del siglo pasado, U. Leupold inició su estudio genético, desde entonces todos los laboratorios que trabajan con *S. pombe* utilizan cepas derivadas de la cepa original de Leupold, este hecho hace que la genética de esta levadura sea bastante uniforme. Hasta la fecha se han caracterizado alrededor de 1.200 genes (<http://www.genedb.org/pombe>). La facilidad con que puede ser genéticamente manipulado la convierte en un excelente modelo para el estudio del control del ciclo celular, mitosis y meiosis, reparación del ADN y recombinación.

En 2002, el genoma de *S. pombe* se secuenció por completo, siendo el sexto genoma eucariota en ser secuenciado después de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y *Homo sapiens* (Wood *et al.*, 2002). Las 13.8 Mb de su genoma se distribuyen en tres cromosomas: I (5.7 Mb), II (4.6 Mb) y III (3.5 Mb), junto con el genoma mitocondrial (20 kb) (Smith *et al.*, 1987). Las conclusiones obtenidas a partir de la secuenciación completa del genoma de *S. pombe* se pueden resumir en:

- ❖ Contiene el menor número de genes codificantes de proteínas conocido para un eucariota: 4.824. Este dato indica que el genoma de *S. pombe* no es tan redundante como el de *S. cerevisiae* u otros organismos.
- ❖ Los centrómeros se encuentran entre 35 y 110 kb, desvelando una compleja organización.
- ❖ Las regiones *upstream* de los genes son más largas que las de *S. cerevisiae*, reflejando posiblemente unas regiones de control más amplias.
- ❖ El 43% de los genes contienen intrones, un total de 4.730.
- ❖ Se han identificado 50 genes similares a genes de enfermedades humanas, la mitad de ellos relacionados con el cáncer.
- ❖ Se han identificados 62 genes altamente conservados en eucariotas, y no presentes en procariotas, importantes en la organización celular eucariota: citoesqueleto, compartimentación, control del ciclo celular, proteólisis, fosforilación y defosforilación de proteínas, y procesamiento del ARN. Se postula que estos genes se podrían haber originado con la aparición de la vida eucariota.

Los análisis de comparación de secuencias y análisis filogenéticos indican que *S. pombe* y *S. cerevisiae* divergieron la una de la otra hace unos 330-420 millones de años, mientras que *S. pombe* divergió de metazoos y plantas hace unos 1.000-1.200 millones

de años. Algunas secuencias génicas son tan divergentes entre las dos levaduras como lo son de sus homólogas humanas. Por lo tanto, no es sorprendente que la biología celular sea tan diferente entre ambas levaduras modelo. Además, muchas proteínas de *S. pombe* son más similares a sus homólogas en humanos que sus homólogas en *S. cerevisiae*. Este resultado hace que muchos consideren a *S. pombe* más cercano a eucariotas superiores que *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

El objetivo original de esta Tesis doctoral fue la identificación de nuevas ADN polimerasas homólogas a la ADN polimerasa β de mamíferos en organismos eucariotas inferiores que participaran en procesos de reparación del ADN. Así, se identificó una nueva ADN polimerasa de la familia X en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* a la que se denominó *SpPol4*. A partir de su identificación surgieron una serie de objetivos adicionales los cuales se recogen en este trabajo.

Como primer objetivo se realizó el clonaje del gen para permitir su expresión heteróloga y su purificación, con el fin de poder demostrar su actividad ADN polimerasa.

Una vez demostrada su actividad ADN polimerasa, se realizó una caracterización bioquímica detallada de esta enzima, con la intención de acumular datos que pudieran sugerir su papel fisiológico. Se realizó un análisis estructura-función de *SpPol4*, con la finalidad de determinar posibles dominios funcionales y sitios activos de la enzima a lo largo de la estructura primaria de la proteína. Así, se identificaron residuos supuestamente esenciales en la interacción de *SpPol4* con los distintos sustratos de la reacción de polimerización. Algunos de estos residuos fueron sustituidos por aminoácidos conservativos desde el punto de vista estructural, aunque tratando de eliminar su función.

En paralelo, con el fin de determinar su papel fisiológico en la célula, se realizó un análisis genético de la delección del gen *pol4⁺* en *S. pombe* en respuesta a diversos agentes que causan diferentes daños en el ADN. Dada la importancia de la Pol β de mamíferos en la reparación del ADN mediante la ruta de BER, se realizó un análisis genético del mutante *pol4 Δ* sencillo y en combinación con otros genes implicados en esta ruta de reparación en *S. pombe*. Además, debido a la participación de otros miembros de la familia X en el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena en el ADN de NHEJ, se realizó un análisis genético del mutante *pol4 Δ* sencillo y en combinación con otros genes implicados en los mecanismos de HR y NHEJ en *S. pombe*.

Por último, se analizó tanto *in vivo* como *in vitro* su participación en mecanismos de tolerancia al daño en el ADN, debido a la capacidad de sintetizar a través de bases nitrogenadas modificadas en la cadena molde del ADN.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LA ADN POLIMERASA 4 DE *S. pombe*

Empleando secuencias correspondientes a las regiones conservadas del centro activo de las ADN polimerasas de la familia X (Oliveros *et al.*, 1997), se llevaron a cabo búsquedas en distintas bases de datos utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Se identificó el marco de lectura abierto SPAC2F.06c en la base de datos pública *Schizosaccharomyces pombe*/GeneDB (<http://www.genedb.org/>), el cual predecía una ADN polimerasa de la familia X que fue denominada ADN polimerasa 4 (*SpPol4*).

2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas de los distintos miembros de la familia X utilizando el programa *MULTALIN* (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>). Posteriormente, el resultado se ajustó manualmente basándose en los elementos de la estructura secundaria de la Pol β de rata, deducidos de su estructura cristalina (Pelletier *et al.*, 1994; Sawaya *et al.*, 1994).

3. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1. Cepa de *Escherichia coli*

Para la amplificación y posterior purificación de los vectores de expresión y sus derivados, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (*supE 44 Dlac U169 ϕ 80lacZ DM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan, 1983). Las células transformadas portadoras de los plásmidos recombinantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina.

3.2. Cepas de *Schizosaccharomyces pombe*

Las cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo se detallan en la **tabla 2**.

Tabla 2. Cepas de *S. pombe*.

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>wild-type</i>	<i>h- leu1-32 ura4D18</i>	J. Jiménez
<i>pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 pol4Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>mag1Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 mag1Δ::ura4+</i>	M. Bjoras
<i>nth1Δ</i>	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 his3-D1 arg3-D4 nth1Δ::ura4+</i>	M. Bjoras
<i>apn2Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 apn2Δ::KanMX4</i>	M. Bjoras
<i>rad2Δ</i>	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 rad2Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>mag1Δ pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 pol4Δ::kanMX4 mag1Δ::ura4+</i>	Esta Tesis
<i>nth1Δ apn2Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 nth1Δ::ura4+ apn2Δ::KanMX4</i>	M. Bjoras
<i>nth1Δ pol4Δ</i>	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 pol4Δ::KanMX4 nth1Δ::ura4+</i>	Esta Tesis
<i>apn2Δ pol4Δ</i>	<i>h+ ura4-D18 leu1-32 his3-D1 pol4Δ::KanMX4 apn2Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>nth1Δ apn2Δ pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 pol4Δ::KanMX4 nth1Δ::ura4+ apn2Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>nth1Δ rad2Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 arg3-D4 nth1Δ::ura4+ rad2Δ::kanMX4</i>	Esta Tesis
<i>rad2Δ pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 rad2Δ::KanMX4 pol4Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>nth1Δ rad2Δ pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 his3-D1 nth1Δ::ura4+ rad2Δ::kanMX4 pol4Δ::kanMX4</i>	Esta Tesis
<i>rhp51Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 rhp51Δ::KanMX4</i>	A. Pastink

<i>pol4Δ rhp51Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 pol4Δ::KanMX4 rhp51::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>RGL2</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 ade6-M26</i>	A. Pastink
<i>pol4Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 pol4Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>pku70Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 pku70Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>pol4Δ pku70Δ</i>	<i>h- ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 pol4Δ::kanMX4 pku70Δ::KanMX4</i>	Esta Tesis
<i>rad22AΔ rad22BΔ</i>	<i>h- leu1-32 ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 rad22AΔ::ura4 rad22BΔ::LEU2</i>	A. Pastink
<i>rad22AΔ</i>	<i>h- leu1-32 ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 rad22AΔ::ura4</i>	Esta Tesis
<i>rad22AΔ pol4Δ</i>	<i>h- leu1-32 ura4-D18 leu1-32 ade6-M26 rad22AΔ::ura4 pol4Δ::kanMX4</i>	Esta Tesis
<i>S1000</i>	<i>h- wee1-50</i>	S. Moreno
<i>S1000 A2</i>	<i>h+ leu1-32 wee1-50</i>	Esta Tesis
<i>wee1-50 pol4Δ</i>	<i>h+ leu1-32 wee1-50 pol4Δ::kanMX4</i>	Esta Tesis

La cepa *wild-type* se utilizó para obtener mediante PCR, usando como molde su ADN genómico, los módulos de interrupción génica *pol4Δ::kanMX4*, *rad2Δ::kanMX4* y *pku70Δ::kanMX4*. Las cepas se obtuvieron mediante interrupción génica o cruce y posterior selección, como se explica más adelante.

3.3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Fuente
W303-1B	MAT α -inc; <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	R. Rothstein
WP4-4A	MAT α -inc; <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pol4Δ::hphMX</i>	Esta Tesis
WR51	MATa; <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 rad51Δ::kanMX</i>	J.A. Tercero
WP4R51-10A	MATa; <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pol4Δ::hphMX rad51Δ::kanMX</i>	Esta Tesis

La cepa W303-1B se utilizó para obtener mediante PCR, usando como molde su ADN genómico, el módulo de interrupción génica *pol4Δ::hphMX*. Las cepas se obtuvieron mediante interrupción génica o cruce y posterior selección, como se explica más adelante.

4. VECTORES DE EXPRESIÓN

Los vectores de expresión utilizados en este trabajo se detallan en la **tabla 4**.

Tabla 4. Vectores de expresión.

Nombre	Tamaño	Características	Referencia
pGEM-T Easy	3.015 pb	Amp ^r , <i>lacZ</i>	Promega
pFA6aKanMX4	2.513 pb	Amp ^r , kanMX4	(Wach <i>et al.</i> , 1994)
pAG32	4.160 pb	Amp ^r , hphMX4	(Goldstein & McCusker, 1999)
pDS473a	8.997 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4</i> ⁺	(Forsburg & Sherman, 1997)

pREP41 GFP/EGFP N	9.493 pb	<i>nmt</i> , LEU2	(Craven <i>et al.</i> , 1998)
pGEM-T <i>Easy-SpPol4</i>	4.568 pb	<i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Esta Tesis
pGEM-T <i>Easy-SpPol4</i> ^{D355A/D357A}	4.568 pb	<i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Esta Tesis
pGEM-T <i>Easy-SpPol4</i> ^{G434Y}	4.568 pb	<i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Esta Tesis
pGEM-T <i>Easy-SpPol4</i> ^{R201A/K234A}	4.568 pb	<i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Esta Tesis
pDS473a- <i>SpPol4</i>	10.542 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4⁺</i>	Esta Tesis
pDS473a- <i>SpPol4</i> ^{D355A/D357A}	10.542 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4⁺</i>	Esta Tesis
pDS473a- <i>SpPol4</i> ^{G434Y}	10.542 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4⁺</i>	Esta Tesis
pDS473a- <i>SpPol4</i> ^{R201A/K234A}	10.542 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4⁺</i>	Esta Tesis
pDS473a-Eso1	11.184 pb	<i>nmt</i> , <i>ura4⁺</i>	Esta Tesis
pREP41 GFP/EGFP N- <i>SpPol4</i>	11.018 pb	<i>nmt</i> , LEU2	Esta Tesis

5. MEDIOS DE CULTIVO

5.1. Medios de cultivo para *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio rico LB (bactotripton 1%, NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%). Para seleccionar transformantes por resistencia a ampicilina, el antibiótico se añadió a una concentración final de 100 µg/ml. El sustrato X-gal (40 mg/ml) se utilizó para seleccionar los plásmidos recombinantes por α -complementación (debido a la ausencia de la actividad β -galactosidasa). Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar a una concentración de 2%.

Los cultivos sembrados en placa se incubaron en estufas a 37°C y para los cultivos líquidos se usaron baños a la misma temperatura con agitación a 250 rpm. Las cepas de *E. coli* se conservaron por periodos no superiores a un mes a 4°C en placas de agar con el medio adecuado. Para la conservación durante largos periodos se almacenaron a -80°C en una solución de glicerol al 15% (v/v).

5.2. Medios de cultivo para *S. pombe*

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en medio rico YES (extracto de levadura 0.5%, glucosa 3%, suplementado con 225 mg/ml de adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina). Las cepas portadoras del gen *kanMX* se seleccionaron en placas de medio YES suplementadas con 200 µg/ml de geneticina (G-418).

Las cepas transformadas con plásmidos cuyo marcador de selección sea un gen de auxotrofia, se seleccionaron en medios selectivos. Para tal fin, se utilizó el medio de cultivo EMM (*Edinburgh minimal medium*) (C₈H₅KO₄ 14.7 mM, NH₄Cl 93.5 mM, Na₂HPO₄ 15.5 mM, sales, vitaminas y minerales, suplementándose con 225 mg/ml de los aminoácidos que se requieran). Para el medio EMM con canavanina se añade 75 mg/l de L-canavanina y se sustituye el NH₄Cl por de ácido glutámico (1 g/l) y para el medio EMM-N₂ no se añade la fuente de nitrógeno, NH₄Cl.

Para reprimir el promotor *nmt1* de los vectores pDS473a y pREP41 GFP/EGFP N, se añadió 15 µM de tiamina al medio EMM.

Para el crecimiento en medio sólido se utilizaron los mismos medios de cultivo, a los que se les añadió agar al 2%. Los cultivos se incubaron en estufa a 30°C o en baños a 200 rpm a la misma temperatura. Las cepas de levadura se conservaron por periodos no superiores a dos meses a 4°C en placas de agar con el medio adecuado.

Para periodos más prolongados se conservaron a -80°C en una solución de glicerol al 20% (v/v).

5.3. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio rico YEPD (bactopeptona 2%, extracto de levadura 1%, glucosa 2%). Las cepas portadoras del gen kanMX4 se seleccionaron en placas de medio YEPD suplementadas con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de geneticina (G-418). Las cepas portadoras del gen hphMX se seleccionaron en placas de medio YEPD suplementadas con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina.

Para el crecimiento en medio sólido se utilizaron los mismos medios de cultivo, a los que se les añadió agar al 2%. Los cultivos se incubaron en estufa a 30°C o en baños a 200 rpm a la misma temperatura. Las cepas de levadura se conservaron por periodos no superiores a dos meses a 4°C en placas de agar con el medio adecuado. Para periodos más prolongados se conservaron a -80°C en una solución de glicerol al 20% (v/v).

6. ENZIMAS, REACTIVOS, NUCLEÓTIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

6.1. Enzimas

La polinucleótido quinasa de T4 (T4 PNK), uracil ADN glicosilasa (UDG) y ADN ligasa de T4 se adquirieron en *New England Biolabs*; la enzima TdT y Pfu ADN polimerasa se obtuvieron de *Promega*; las endonucleasas de restricción, fosfatasa alcalina de gamba, Klenow y Taq Expand High Fidelity fueron adquiridas en *Roche*; la hAPE fue cedida por el Dr S. H. Wilson (NIEHS, Research Triangle Park, NC). Las Pol α y Pol μ humanas purificadas se obtuvieron como se describió anteriormente (Domínguez *et al.*, 2000; García-Díaz *et al.*, 2002).

6.2. Reactivos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos, fueron suministrados por *Merck*, *Sigma* y *Fluka*. Los componentes de los medios de cultivo por *Difco* y *BIO 101*.

6.3. Nucleótidos

Se utilizaron desoxinucleótidos y ribonucleótidos ultrapuros no marcados adquiridos en *Amershan Biosciences* y los nucleótidos marcados radioactivamente; [γ - ^{32}P]ATP, [α - ^{32}P]dATP y [α - ^{32}P]dCTP (3000Ci/mmol) adquiridos en *Amershan Biosciences* y *Perkin Elmer*.

6.4. Oligonucleótidos

Los diferentes oligonucleótidos sintéticos empleados se obtuvieron de *Invitrogen*.

A continuación se detallan las secuencias y características de todos los oligonucleótidos que se utilizaron en este trabajo.

Tabla 5. Secuencia de cebadores específicos para la interrupción génica en *S. pombe* (en negrita secuencia homologa al vector pFA6a-kanMX4) y *S. cerevisiae* (en

negrita secuencia homologa al vector pAG32).

Nombre	Secuencia 5'-3'
SPAC2F06.A	TCCCTTAGTTGTAATTGTTCAAAATGAAGATTCTTGCAAG CAGCTGAAGCTTCGTACGCT
SPAC2F06.B	AGTAATGTGGCGATCTTAAGGTCAAGATAGGTATTTACTACT AGTGGATCTGATATCATC
POL4.A	AATAAGTAAAGGATAAACATGCGACCTGTTAGACAAATCGC CAGCTGAAGCTTCGTACGCT
POL4.B	ATGATTATTAAGATTTTTTATTAATAAAAAAATTCGCTCCTCCT AGTGGATCTGATATCATC
rad2.D	CTCTAAGCTAGTTTTTGGAGAAAGCGTTGTTCCGGGATCTCGTAATATACATAAATAAGTAT CAGCTGAAGCTTCGTACGCT
rad2.E	AGTTTTATCTACATGCGTCTTGCTTTTTTTTAAGTTTTTTTTTTTAGATTAAATAACAATTAC CTAGTGGATCTGATATCATC
pku70.A	AAAAAGCCAAGGAAATGTGTTTTTGATAATCTGTTTTTTTACC CAGCTGAAGCTTCGTACGCT
pku70.B	AAACATGATGCTGATATTTAATCCTTTAATATTTTCTTGT CTAGTGGATCTGATATCATC

Tabla 6. Secuencia de cebadores específicos para comprobar la delección en *S. pombe* y *S. cerevisiae*.

Nombre	Secuencia 5'-3'
SPAC2F06.C	AGATCTGTTCAAAATGAAGATTCTTG
SPAC2F06.D	CTGCAGAGTAATGTGGCGATCTTAAGG
POL4.C	TGGGGCTAATAATTTTAAGGG
POL4.D	TTCTTTTCTCTTTCCCATCC
rad2.F	CTGCTCGATTTTGAGGAGT
rad2.G	CGTAAAAGTCATGCATTAA
pku70.C	TAGTTATTTTCATTCGTGTGCT
pku70.D	CAAAATTCTTTTTCTTCCTGT

Tabla 7. Secuencia de cebadores específicos para amplificar el marco de lectura abierto SPAC2F.06c a partir de ADN genómico de *S. pombe* (dianas de enzimas de restricción en negrita, subrayados los codones de iniciación y terminación).

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>Sp</i> Pol4.5'BgX	AGATCTTGCTCGAGC <u>ATGAAGATTCTTGCAAGAAGATTCTTGCAAGCA</u>
<i>Sp</i> Pol4.3'STOPNBg	AGATCTGCGGCCGCC <u>CTATCCCGTGTTACGAAACTTT</u>

Tabla 8. Secuencia de cebadores específicos para amplificar el gen *Eso1*⁺ a partir de ADN genómico de *S. pombe* (dianas de enzimas de restricción en negrita, subrayados los codones de iniciación y terminación).

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>Eso1</i> .5'BgX	CTCGAGCTAGATCT <u>ATGGAATTAGGCAAAAGCAAATTCTC</u>
<i>Eso1</i> .3'NBg	CTCGAGATCT <u>TCAACTTTTCATAAACAGCATATCGAAG</u>

Tabla 9. Secuencia de cebadores específicos diseñados para realizar mutagénesis dirigida en el vector pGEM-T *Easy-Sp*Pol4.

Nombre	Secuencia 5'-3'
<i>Sp</i> Pol4D2A.A	GCCTGTTGGAGCGGCCGTTGCTATGGTGTGAGTCC
<i>Sp</i> Pol4D2A.B	GGACTCAACACCATAGCAACGGCCGCTCCAACAGGC
<i>Sp</i> Pol4R201A.5	CGGTGAATCAGTAGCGACTAGGGCATAACGG
<i>Sp</i> Pol4R201A.3	CCGTATGCCCTAGTCGCTACTGATTACCG

<i>Sp</i> Pol4K234A.3	CGGTTGTGGGCCCCGAATAGTACATCTTTGG
<i>Sp</i> Pol4K234A.5	CCAAAGATGTACTATTGCGGGCCCACAACCG
<i>Sp</i> Pol4G434Y.3	GGCTCTGCCGTATTATATTGGAGTGGAGG
<i>Sp</i> Pol4G434Y.5	CCTCCACTCCAATATAATACGGCAGAGCC

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para los ensayos de actividad y retraso en gel (EMSA).

Nombre	Secuencia 5'-3'
P15	TCTGTGCAGGTTCTT
P15(C)	TCTGTGCAGGTTCTC
T32(A)	TGAAGTCCCTCTCGACAAAGAACCTGCACAGA
T32(C)	TGAAGTCCCTCTCGACCAAGAACCTGCACAGA
T32(G)	TGAAGTCCCTCTCGACGAAGAACCTGCACAGA
T32(T)	TGAAGTCCCTCTCGACTAAGAACCTGCACAGA
D15	TCGAGAGGGACTTCA
D16	TCGAGAGGGACTTCA
PoliT(dT) ₁₅	TTTTTTTTTTTTTTTTT
P6	CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC
P6-1	CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTA
T4	CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC
T4(8G)	GTACCCGGGGATCCGTAC8GGCGCATCAGCTGCAG
SP1C	GATCACAGTGAGTAC
T13(C)	AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC
T18(T)	ACTGGCCGTCTTCTATTGTACTCACTGTGATC
DG1	AGATACACTTCT
DG5	AACGACGGCCAGT
D-loop	GAACCTGCAGGTGGGCGGCTGCTCATCGTAGGTTAGTATCGACCTATTGGTAGAATTCGGCAGCG
C	AAGATGTCCTAGCAAGGCACCCTAGTAGC
M	CTTGGACGTCCACCCGTTTCTACAGGATCGTTCCGTGGGATCATCGCACCATCTTAAGCCGTGCG
F15	TTAGTATCGACCTATTGGTAGAATTCGGCAGCG
F10	ATCGACCTATTGGTAGAATTCGGCAGCG
Pber	CTGCAGCTGATGCGC
Pber(C)	CTGCAGCTGATGCGCC
Pber(A)	CTGCAGCTGATGCGCA

7. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR

7.1. Transformación de *E. coli*

Las células se hicieron competentes según el método de cloruro de rubidio y se transformaron mediante choque térmico (Hanahan, 1983).

7.2. Transformación de *S. pombe*

Las cepas de levadura se hicieron competentes según el método de acetato de litio y se transformaron mediante choque térmico tal y como se describe en Moreno *et al.* (1991).

8. INTERRUPCIÓN GÉNICA

La interrupción de los distintos genes se realizó utilizando un marcador de resistencia a geneticina, KanMX4, el cual codifica una proteína con actividad aminoglicósido fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y a geneticina (G-418) en levaduras (Jiménez & Davies, 1980). Para realizar la interrupción génica se siguió el protocolo descrito en Bahler *et al.* (1998), utilizando unos cebadores específicos para cada gen que contienen la secuencia homologa al vector pFA6a-kanMX4 en *S. pombe* y la secuencia homologa al vector pAG32 en *S. cerevisiae*.

En *S. pombe*, se utilizaron los cebadores SPAC2F06.A y SPAC2F06.B para delecionar el gen *pol4*⁺, rad2.D y rad2.E para delecionar el gen *rad2*⁺ y pku70.A y pku70.B para delecionar el gen *pku70*⁺. Para delecionar el gen *POL4* de *S. cerevisiae* se utilizaron los cebadores POL4.A y POL4.B (Tabla 5).

Las delecciones se confirmaron por PCR utilizando los oligos de la tabla 6 y mediante *Southern blot*, como se explica en el siguiente apartado.

9. DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN O SOUTHERN BLOT

Se extrajo el ADN genómico de los clones seleccionados, digiriéndose 5 µg con la enzima *EcoRI* durante 5 h a 37°C. El ADN digerido se separó en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). El gel se depurinizó parcialmente en HCl 0.25 N durante 10 min, se lavó con agua y se equilibró en el tampón de desnaturalización NaOH 0.4 N durante 30 min. A continuación se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente *Hybond-N+* (Amersham Biosciences).

Las sondas que se utilizaron para el *Southern blot* se obtuvieron de la digestión del plásmido pFA6a-kanMX4 con *SmaI* y *EcoRV* para obtener la sonda Kan y el plásmido pDS473a digerido con *HindIII* para obtener la sonda Ura4⁺. Los plásmidos digeridos se separaron en un gel de agarosa al 0.8% (p/v), se cortó la banda deseada y se utilizó el sistema de extracción *QIAquick* (Qiagen) para su purificación.

Se marcó radiactivamente 200 µg de sonda utilizando [α -³²P]dATP y la enzima *Klenow*, 1 h a 37°C. Se prehibridó la membrana 1 h a 65°C en la solución de hibridación (tampón fosfato sódico pH 7 0.5 M, SDS 7%). A continuación se añadió la sonda marcada y se hibridó toda la noche a 65°C. Se realizaron tres lavados con tampón de lavado (SSPE 0.1X, EDTA 0.5 M, SDS 0.5%) y se analizó mediante autorradiografía.

10. DETECCIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS A MEMBRANA O WESTERN BLOT

Tras separar las proteínas en geles SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad*) que se humedeció previamente en metanol para su activación. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de *Bio-Rad* en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 19 mM y metanol 20%, aplicando durante 90 min una corriente de 250 mA.

La membrana se bloqueó en tampón de bloqueo (leche desnatada 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario, una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo de anticuerpo anti-GST (*Sigma*), durante 1 h en agitación a

temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 0.5% y se incubó con el anticuerpo secundario con actividad peroxidasa, una dilución 1:500 en PBS-Tween de anticuerpo oveja anti-ratón (*Amershan Life Science*), durante 30 min-1 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.5%. La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (*Amershan Life Science*).

11. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

11.1. Purificación de la ADN polimerasa 4 de *S. pombe*

La expresión de *SpPol4* se realizó en una cepa de *S. pombe* *pol4Δ::KanMX* transformada con el plásmido pDS473a-*SpPol4* por el método de acetato de litio. Estas células transformadas se cultivaron en medio EMM suplementado con leucina, dejando que crecieran 18-20 h (Abs_{600nm} final=1). Posteriormente, se recogió el cultivo a 4°C y se lavó con tampón de parada (NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 10 mM y NaN_3 1 mM, pH 8). El sedimento de las células se pesó y se congeló a -80°C.

Antes de empezar a purificar, se descongelaron 20 gramos de células a 4°C en 50 ml de tampón de lisis frío (PBS, NaF 50 mM, EDTA 2 mM pH 8, NP-40 1%, p-NH₂-benzamidina 1.3 mM, PMSF 1 mM y una pastilla de un cóctel de inhibidores de proteasas de *Roche*). Se lisó con 50 ml de bolitas de vidrio (425-600 μ m *Sigma*) durante 1 min 3 veces con una *Beadbeater* (*Biospec*). Se añadió KCl al lisado hasta una concentración de 0.2 M. Los restos celulares se separaron de la fracción soluble por centrifugación (50.000 g 1 h en el rotor *Beckman JA-25.50*). La proteína de la fracción soluble se sometió a una cromatografía de afinidad. Se empaquetó en una columna *Gluthation-Sepharose 4B* (*Pharmacia*) y equilibró con 10 volúmenes de tampón de lisis. Se cargó la fracción soluble en la columna, pasándola a una velocidad de 3 ml/h. Una vez pasada toda la muestra se lavó con tampón IPP150 (PBS, NP-40 0.1%) y se equilibró con el siguiente tampón (Tris-HCl 100 mM, pH 8, NaCl 100 mM). La elución de la columna se realizó a una concentración de *gluthathion* 50 mM. Los eluidos de la columna se evaluaron mediante electroforesis en geles 10% SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. La concentración de proteína se estimó por densitometría de geles 10% SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, utilizando concentraciones conocidas de otra proteína. Para su conservación se añadió glicerol hasta un 50% (v/v) y se suplementó con 0.1 mg/ml de BSA, guardándose a -80°C.

Este mismo protocolo se utilizó para expresar y purificar los mutantes descritos en esta Tesis, los cuales fueron obtenidos por mutagénesis dirigida por PCR sobre el plásmido pGEM-T *Easy-SpPol4* (*Promega*) como se explica más adelante.

11.2. Purificación de la Pol η (Eso1) de *S. pombe*

La expresión de Eso1 se realizó en una cepa *wild-type* de *S. pombe* transformada con el plásmido pDS473a-Eso1 por el método de acetato de litio. Estas células transformadas se cultivaron en medio EMM suplementado con leucina, dejando que crecieran 18-20h (Abs_{600nm} final=1). Posteriormente, se recogió el cultivo a 4°C y se lavó con tampón de parada (NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 10 mM y NaN_3 1 mM, pH8). El sedimento de las células se pesó y congeló a -80°C. Se utilizó el mismo protocolo que el usado para purificar *SpPol4*, descrito en el apartado anterior.

12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR

Las mutaciones puntuales seleccionadas se introdujeron en el vector pGEM-T *Easy-SpPol4* mediante un sistema basado en la amplificación por PCR (*QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene*) utilizando los siguientes oligonucleótidos: el oligonucleótido *SpPol4D2A.A* y su complementario *SpPol4D2A.B* para introducir la doble mutación D355A/D357A y generar el mutante *SpPol4*^{D355A/D357A} catalíticamente inactivo; el oligonucleótido *SpPol4G434Y.5* y su complementario *SpPol4G434Y.3* para generar el mutante *SpPol4*^{G434Y}; y para introducir la doble mutación R201K234A se utilizaron los oligonucleótidos *SpPol4R201A.5* y *SpPol4K234A.5* y sus respectivos complementarios *SpPol4R201A.3* y *SpPol4K234A.5*, generando el mutante *SpPol4*^{R201A/K234A}. Tras comprobar mediante secuenciación que se habían introducido las mutaciones deseadas, se introdujeron las secuencias codificantes mutadas en el vector de expresión de *S. pombe* pDS473a para ser posteriormente purificadas como se ha descrito en el apartado anterior para *SpPol4*.

13. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en 50 ml de medio rico YES hasta alcanzar fase logarítmica (Abs_{600nm} : 0.4-0.8). Posteriormente, se recogió el cultivo a 4°C y se lavó con tampón de parada (NaCl 150 mM, NaF 50 mM, EDTA 10 mM y NaN_3 1 mM, pH 8). El sedimento de las células se congeló a -80°C.

Las células descongeladas en hielo se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis frío (PBS, NaF 50 mM, EDTA 2 mM pH 8, NP-40 1%, p-NH₂-benzamidina 1.3 mM, PMSF 1 mM y una pastilla de un cóctel de inhibidores de proteasas de Roche) y se lisó con el mismo volumen de bolitas de vidrio (425-600 µm Sigma) a 4°C durante 30 min con un VIBRAX VXR (IKA). Se recogió el lisado, se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C para eliminar los restos celulares, y se recogió la fracción soluble guardándose a -80°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad).

14. ENSAYO DE ACTIVIDAD 3' → 5' EXONUCLEASA

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 µCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T32(C) en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La mezcla de incubación tiene un volumen de 12.5 µl que contiene, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 50 nM de *SpPol4* y 1.5 nM de ADN marcado. Las muestras se incubaron 15 min a 30°C y la reacción se paró añadiendo tampón de carga (EDTA 10 mM, formamida 95%, xilencianol 0.1%, azul de bromofenol 0.1%). La exonucleólisis 3' → 5', produce una degradación progresiva del cebador marcado P15. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15. ENSAYO DE ACTIVIDAD POLIMERASA

15.1. Ensayos de actividad polimerasa con ADN activado

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l, en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, [α - 32 P]dCTP 13.2 nM, 1 μ M (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), $MnCl_2$ 1 mM ó $MgCl_2$ 10 mM como cofactor, 625 ng de ADN activado de timo de ternera y 250 mM de proteína *SpPol4* o del mutante ensayado en cada caso. Tras una incubación de 30 min a 37°C las reacciones se pararon añadiendo EDTA 10 mM, y las muestras se filtraron por centrifugación en columnas de *Sephadex* G-50. La actividad ADN polimerasa, proporcional a la radioactividad presente en el volumen excluido, se determinó por conteo de la radiación Cerenkov.

15.2. Ensayos de actividad polimerasa dependiente de molde

15.2.1. Análisis de procesividad

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP (0.1 μ Ci) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T18(T) en presencia de Tris-HCl 50 mM pH7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μ l que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 100 μ M de dNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y concentraciones de *SpPol4* decrecientes desde 250 hasta 1.5 nM. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.2. Análisis de fidelidad en moléculas que contienen un hueco de un nucleótido con un grupo fosfato en 5'

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP (0.1 μ Ci) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con los siguientes oligonucleótidos T32(A, C, G o T)/D16 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μ l que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1mg/ml, las concentraciones indicadas de dNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y 125 nM *SpPol4*. Después de una incubación de 15 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. Se utilizó *Fuji BAS1000* para cuantificar.

15.2.3. Análisis de incorporación de rNTPs

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con los siguientes oligonucleótidos T32(A, C, G o T)/D16 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, mezcla de los nucleótidos complementarios (rNTP+dNTP) a una concentración de 100 mM, 4 nM del sustrato marcado en 5' y 125 nM *SpPol4*. Después de una incubación de 15 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. Se utilizó *Fuji BAS1000* para cuantificar. El factor de selección del azúcar se obtiene como la relación entre la cantidad cebador extendido de rNTP frente a dNTP.

15.2.4. Análisis de incorporación de rNTPs en un sustrato tipo molde/ cebador abierto

El oligonucleótido C se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido M, formando un sustrato del tipo molde/ cebador abierto, en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 25 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, las concentraciones indicadas de dNTPs y rNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y 125 nM *SpPol4*. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.5. Ensayos de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal)

Para evaluar la actividad transferasa terminal se utilizó el oligonucleótido PoliT (dT)₁₅ de cadena sencilla marcado radioactivamente en su extremo 5' con [α - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, MgCl_2 2 mM ó MnCl_2 1 mM como cofactores, 10 μM de cada dNTP individualmente, y TdT (90 nM) o *SpPol4* (600 nM). Después de una incubación de 30 min a 30°C, las reacciones se pararon con tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). La extensión del oligo dT marcado en 5' se analiza mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior

autorradiografía.

15.2.6. Análisis de dislocación mediada por deslizamiento

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T32(A)/D16 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 10 μM de cada dNTP individualmente, 4 nM del sustrato marcado en 5', y Pol μ (500 nM), Pol λ (100 nM) y SpPol4 (5000 nM). Después de una incubación de 15 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.7. Análisis de dislocación mediada por la selección del dNTP

El oligonucleótido P15 se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T32(G)/D16 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 10 μM de cada dNTP individualmente, 4 nM del sustrato marcado en 5', y Pol μ (500 nM), Pol λ (100 nM) y SpPol4 (5000 nM). Después de una incubación de 15 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.8. Análisis de recolocación del cebador

El oligonucleótido P15(C) se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T32(G)/D16 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 10 μM de cada dNTP individualmente, 4 nM del sustrato marcado en 5', y 250 nM de cada ADN polimerasa; Pol μ , Pol λ y SpPol4. Después de una incubación de 15 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.9. Análisis de la capacidad de desplazar banda e incorporar dNTPs

El oligonucleótido C se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con una serie de oligonucleótidos para formar los siguientes sustratos: (M/C), (M/C/D-loop), (M/C/F15) y (M/C/F10) en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 25 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, las concentraciones indicadas de dNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y 100 nM *SpPol4*. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.10. Análisis de inserción frente a la base modificada 8-oxoG

El oligonucleótido Pber se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T4 o T4(8G) en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 5 nM del sustrato marcado en 5', 100 nM de cada ADN polimerasa; *Eso1* y *SpPol4*, y una concentración de dNTP de 10 μM para *Eso1* y 1 μM para *SpPol4*. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

15.2.11. Análisis de extensión desde pares cuya base molde es 8-oxoG

Los oligonucleótidos Pber(C) y Pber(A) se marcaron radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Los oligonucleótidos marcados se hibridaron con los oligonucleótidos T4 y T4(8G) en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 12.5 μl que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 5 nM del sustrato marcado en 5', 100 nM de cada ADN polimerasa; *Eso1* y *SpPol4* y 1, 10 y 100 μM de dGTP. Después de una incubación de 30 min a 30°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

16. ENSAYOS DE RETRASO EN GEL (EMSA)

Para el ensayo EMSA se utilizaron las siguientes moléculas de ADN de doble cadena con huecos de un único nucleótido [SP1C/T13(C)/DG1] o de 5 nucleótidos [SP1C/T18(T)/DG5] y moléculas de ADN molde/*downstream* [T13(C)/DG1] para analizar la interacción de *SpPol4* y el ADN. Los ensayos de retardo en gel se realizaron en una mezcla de incubación con un volumen final de 12.5 μ l que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT 1 mM, BSA 0.1 mg/ml, glicerol 4%, 4 nM de ADN marcado y diferentes cantidades de *SpPol4* (250, 600 y 1200 nM). Las muestras se incubaron 10 min a 30°C para permitir la formación del complejo enzima-ADN. Para realizar un análisis de competición, se incubó 100 nM *SpPol4* con 4 nM de una molécula marcada con un hueco que contiene un grupo fosfato en 5' durante 15 min a 30°C en un volumen final de 25 μ l. Después de la formación de los complejos, se añadieron a la mezcla de reacción 200 y 600 nM de moléculas con un hueco de un nucleótido con un grupo fosfato en 5' no marcado o la misma cantidad de la misma molécula, pero con un grupo hidroxilo en 5' no marcada, y se incubaron otros 10 min a 30°C. Después de la incubación, se mezclaron las muestras con 3 μ l de glicerol 30% y se resolvió en un gel de electroforesis nativo con 4% gel de poliacrilamida (80:1 monómero/bis) y posterior autorradiografía. Los complejos ADN polimerasa-ADN se detectaron por un retraso en la movilidad respecto a la posición del ADN libre marcado. La cuantificación de estos experimentos de competición se realizó en *Fuji BAS1000*. La cantidad de GAP1-P marcado que forma complejos *SpPol4*::GAP1-P se calcula normalizando la señal de radioactividad en la banda retrasada respecto a la radioactividad total.

17. ENSAYO DE ACTIVIDAD DESOXIRIBOSAFOSFATO LIASA (dRP LIASA)

El oligonucleótido P6-1, con un uracilo en posición 16, se hibridó con el oligonucleótido complementario T4 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M. Este híbrido P6-1/T4 forma una molécula del tipo molde/cebador susceptible de ser marcada en el extremo 3' del cebador empleando *Klenow* (2 unidades) y [α -³²P]dCTP (0.5 μ Ci). Este sustrato de ADN de doble cadena marcado (500 nM) se incubó con Uracil ADN glicosilasa (UDG, 100 nM) 20 min a 37°C, con un tampón que contiene 50 mM de HEPES pH 7.5, KCl 20 mM y DTT 2 mM, para eliminar el uracilo. Después de la incubación, la mezcla se suplementa con $MgCl_2$ 10 mM y 40 nM de AP-endonucleasa humana (hAPE), incubándose 30 min a 37°C; así, se origina un sustrato para la actividad dRP liasa.

La mezcla de reacción en 25 μ l contiene HEPES 50 mM pH 7.5, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 20 mM, DTT 2 mM, 70 nM del sustrato tratado y diferentes cantidades de Pol β (500 nM), Pol λ (500 nM), Pol μ (1 μ M), *SpPol4* (100, 250, 500 y 1000 nM), *SpPol4*^{D355A/D357A} (100, 250, 500 y 1000 nM) y *SpPol4*^{R201A/K234A} (100, 250, 500 y 1000 nM), ó 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 μ g de extracto de células totales de las cepas *wild-type* y *pol4 Δ* . Después de una incubación de 20 min a 37°C, se añadió $NaBH_4$ a una concentración final de 340 mM, dejando la reacción 20 min en hielo. Los productos de ADN se precipitaron con etanol en presencia de 0.1 g/ml de ARNt, se resuspendieron en agua y se analizaron en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

18. ENSAYO DE REDUCCIÓN CON NaBH_4

Se utiliza el mismo sustrato que para la actividad dRP liasa, obtenido tal y como se explica en el apartado anterior. La mezcla de reacción en 10 μl contiene HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl_2 10 mM, KCl 20 mM, DTT 2 mM, 100 nM del sustrato empleado para la actividad dRP liasa, diferentes cantidades de Pol β (250 nM), Pol λ (250 nM), Pol μ (250 nM), SpPol4 (1000 y 1500 nM) y SpPol4^{R201A/K234A} (1000 y 1500 nM), y NaBH_4 20 mM o NaCl 20 mM. Después de una incubación de 30 min en hielo, las reacciones se resolvieron en un gel de 10% poliacrilamida-SDS, visualizándose los complejos polimerasa-ADN en una autorradiografía.

19. ENSAYO DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASE

Se utiliza el mismo sustrato que para la actividad dRP liasa, obtenido tal y como se explica en el apartado anterior. La mezcla de reacción de 25 μl contiene HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl_2 10 mM, KCl 20 mM, DTT 2 mM, [α -³²P]dCTP 0.3 μM , 100 nM del sustrato empleado para la actividad dRP liasa, diferentes cantidades de Pol β (50 nM), Pol λ (50 nM) y SpPol4 (50 nM), incubándose 20 min a 37°C. Después, cada reacción se divide en dos mitades. Una se incubó con dATP 1 mM y 40U de ADN ligasa de T4 10 min a 37°C y la otra se hizo en paralelo sin añadir nada. La reacción finaliza con la adición de tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

20. ENSAYO DE ACTIVIDAD AP LIASA

El oligonucleótido P6, el cual contiene un uracilo en posición 16, se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μCi) y T4 PNK (10 unidades). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T4 en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M. El híbrido P6/T4 se incubó con Uracil ADN glicosilasa (UDG, 100 nM) durante 20 min a 37°C, con un tampón que contiene 50 mM de HEPES pH 7.5, KCl 20 mM y DTT 2 mM, para eliminar el uracilo; así, se origina un sustrato con un sitio abásico en posición 16 para la actividad AP liasa.

La mezcla de reacción en 25 μl contiene HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl_2 10 mM, KCl 20 mM, DTT 2 mM, 70 nM del sustrato tratado y diferentes cantidades de Pol β (500 nM), Pol λ (500 nM) y SpPol4 (500, 1000 y 2000 nM). Después de una incubación de 30 min a 30°C, las reacciones se pararon con tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Se resolvieron y analizaron los productos mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

21. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES GENOTÓXICOS MEDIANTE TEST DE GOTA

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en el medio rico YES hasta alcanzar fase logarítmica ($\text{Abs}_{600\text{nm}}$: 0.4-0.8). Se hicieron diluciones seriadas en agua, desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} . Alicuotas (4 μl) de células en suspensión se sembraron por goteo en placas de medio rico YES carentes de agentes genotóxicos (control) o conteniendo

varias dosis de los agentes genotóxicos indicados en cada ensayo. Las células se incubaron a 30°C entre 3 y 5 días.

22. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA SENSIBILIDAD A MMS MEDIANTE CURVAS DE VIABILIDAD

Se añadió 0.2% de MMS a cultivos de *S. pombe* en fase logarítmica (Abs_{600nm} : 0.4-0.8). Se tomaron muestras de los diferentes cultivos cada 10, 20, 40 y 60 min, se diluyeron y se sembraron en placas de medio rico YES. Las placas se incubaron entre 3 y 5 días a 30°C. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

23. SINCRONIZACIÓN DE *S. pombe* EN LA FASE G1 DEL CICLO CELULAR MEDIANTE LA ELIMINACIÓN DE N_2 DEL MEDIO

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en el medio mínimo hasta alcanzar fase logarítmica (Abs_{600nm} : 0.4-0.8), se lavaron tres veces en medio EMM- N_2 y se resuspendieron en este mismo medio a una concentración de $1-5 \times 10^6$ células ml^{-1} . Se incubaron 72 h (al menos 4 generaciones) a 24°C con agitación.

24. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA SENSIBILIDAD A IR MEDIANTE CURVAS DE VIABILIDAD

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en el medio rico YES hasta alcanzar fase logarítmica (Abs_{600nm} : 0.4-0.8) o se sincronizan en la fase G1 del ciclo celular como se explica en el apartado anterior. Los cultivos sincronizados se diluyen hasta una Abs_{600nm} de 0.5. Las células se irradiaron a 2.8 Gys/min las dosis indicadas en cada ensayo: 50, 100, 150, 200, 250 y 500 Gys. Los cultivos se diluyeron y se sembraron en placas de medio rico YES. Las placas se incubaron entre 3 y 5 días a 30°C ó a 37°C en el caso de la cepa termosensible *wee1-50*. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

25. ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DE MUTAGÉNESIS ESPONTÁNEA E INDUCIDA (ENSAYO DE RESISTENCIA A CANAVANINA)

Las cepas de *S. pombe* se cultivaron en un medio carente de arginina hasta la saturación del cultivo. Se sembraron 5×10^8 células en placas de medio mínimo con ácido glutámico como fuente de nitrógeno y 75 mg/ml de canavanina (*Sigma*). En el caso del análisis de la frecuencia de mutación inducida se añadieron a las placas 0.01% de MMS. Las placas se incubaron entre 7 y 9 días a 30°C. La frecuencia de mutación se calculó como la proporción entre el número de células resistentes a canavanina y el número de células totales. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

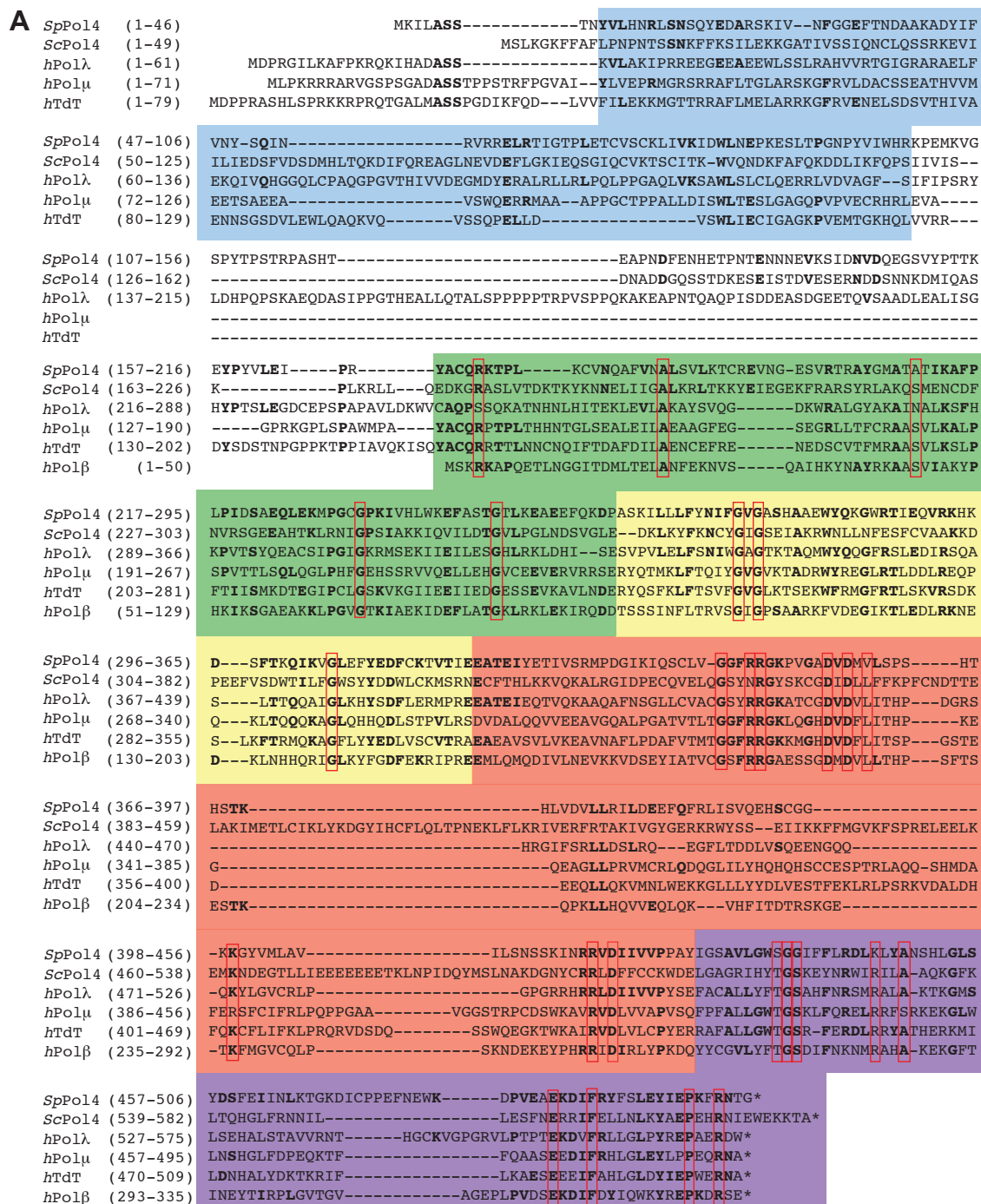
RESULTADOS

**I. Análisis estructura-función de la ADN
polimerasa 4 de *Schizosaccharomyces pombe***

1. IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA ADN POLIMERASA DE *Schizosaccharomyces pombe*

Los distintos miembros de la familia X de ADN polimerasas presentan una elevada conservación de secuencia, especialmente en sus regiones catalíticas (Oliveros *et al.*, 1997). Tras la identificación del gen de una ADN polimerasa X del virus de la peste porcina africana (VPPA), se empleó la secuencia de este gen para realizar búsquedas en bancos de datos y así identificar nuevos miembros de la familia X. De este modo, se identificaron las ADN polimerasas humanas y murinas Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2000) y Pol μ (Domínguez *et al.*, 2000). Además, se conocen ortólogos de la TdT y Pol β en distintos vertebrados y se han identificado proteínas homólogas en levaduras, protozoos, bacterias y arqueas (Aravind & Koonin, 1999). Esta estrategia permitió identificar el marco de lectura abierto SPAC2F.06c en la base de datos pública de *Schizosaccharomyces pombe*/GeneDB (<http://www.genedb.org/>), el cual predecía una ADN polimerasa de la familia X que fue denominada ADN polimerasa 4 (*SpPol4*).

La **figura 6.A** muestra un alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de *SpPol4* con la PolX de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScPol4*) y las polimerasas humanas Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT. Como se puede predecir por el alineamiento de la secuencia aminoacídica, *SpPol4* presenta una organización modular común con los miembros de esta familia; una estructura básica tipo Pol β , compuesto por un dominio de unión al ADN de 8 kDa y un dominio de polimerización de 31 kDa formado por los subdominios *dedos*, *palma* y *pulgar* (Ruiz *et al.*, 2001; Bebenek & Kunkel, 2004) (**Figura 6B**). El alineamiento muestra que estas enzimas son claramente homólogas, aunque con un grado diferente de similitud entre sus secuencias aminoacídicas. A diferencia de mamíferos, las levaduras poseen una única polimerasa de la familia X, *SpPol4*, la cual estaría más cerca evolutivamente de Pol μ , con la que comparte un 27% de identidad respecto a la secuencia aminoacídica de la estructura básica tipo Pol β , seguida de Pol λ con la que comparte un 24% de identidad en la estructura básica tipo Pol β , siendo la similitud con Pol β (20%) significativamente inferior. *SpPol4* conserva 23 de los 27 residuos aminoacídicos invariantes en las polimerasas de la familia X, incluyendo los residuos esenciales para la catálisis, los residuos importantes para la unión del ADN, del metal y del nucleótido, así como los implicados en cambios conformacionales tras la formación del complejo ternario (Oliveros *et al.*, 1997). Adicionalmente, *SpPol4* presenta una extensión N-terminal inexistente en Pol β , pero presente en Pol λ , Pol μ , TdT y *ScPol4*. Esta región contiene un dominio denominado BRCT (dominio BRCA1 C-terminal) que podría estar implicado en las interacciones proteína-proteína o proteína-ADN al igual que en sus enzimas homologas, Pol λ (Ma *et al.*, 2004; Nick McElhinny *et al.*, 2005), Pol μ (Mahajan *et al.*, 2002) y *ScPol4* (Tseng & Tomkinson, 2004). Además, al igual que Pol λ y *ScPol4*, *SpPol4* presenta una región rica en serinas, treoninas y prolinas entre el dominio BRCT y el *core* tipo Pol β , la cual podría constituir un dominio diana de modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones y glicosilaciones, que pudieran regular la actividad de *SpPol4* (García-Díaz, *et al.*, 2000).

**B**

estructura básica tipo Polβ



Figura 6. Estructura primaria de *SpPol4*. (A) Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de *SpPol4*, *ScPol4* y las polimerasas humanas *Polβ*, *Polλ*, *Polμ* y *TdT*. Los números entre paréntesis indican la posición relativa de los residuos en función del N-terminal de cada ADN polimerasa. A excepción de *Polβ*, *SpPol4*, *ScPol4*, *Polλ*, *Polμ* y *TdT* presentan un dominio BRCT en su región N-terminal (azul). De acuerdo con los datos estructurales de *Polb* (Pelletier et al., 1994) se resaltan los segmentos correspondientes al dominio de 8 kDa (verde), *dedos* (amarillo), *palma* (rojo) y *pulgar* (morado). En un recuadro rojo se muestran los residuos invariantes entre las ADN polimerasas de la familia X (Oliveros et al., 1997). **(B)** Organización modular de *SpPol4* en la que se indican los diferentes subdominios. S/P corresponde con la región rica en serinas y prolínas.

2. FILOGENIA

Las ADN polimerasas de la familia X están presentes en los tres taxones monofiléticos: *Eucarya*, *Bacteria* y *Archaea*. En mamíferos, hay cuatro miembros de ADN polimerasas de la familia X: Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT. Sin embargo, levaduras, plantas, algunas bacterias y virus poseen solamente una enzima PolX. Existen dos organismos modelo, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, cuyos genomas se han secuenciado por completo, en los que no se ha identificado ninguna PolX (Burgers *et al.*, 2001).

El marco de lectura abierto SPAC2F.06c, el cual codifica la PolX de *S. pombe*, SpPol4, se utilizó para realizar una búsqueda de proteínas homólogas en las bases de datos existentes (BLAST, NCBI). De esta manera se confirmó que dicha secuencia tenía una pauta de lectura abierta de elevada similitud con las ADN polimerasas de la familia X de mamíferos Pol λ , Pol μ y TdT (datos no mostrados). Además, los resultados del BLAST nos muestra una elevada similitud con PolXs de hongos identificadas al secuenciar sus genomas. La **figura 7** muestra un alineamiento múltiple de aminoácidos correspondiente al centro activo de polimerización de las secuencias homólogas obtenidas de hongos, junto con SpPol4. En este segmento se pueden observar dos de los tres aspárticos catalíticos, así como una serie de residuos conservados entre todos los miembros de la familia X de ADN polimerasas. En el resultado del BLAST no aparece ninguna secuencia correspondiente a PolXs de otras levaduras, entre ellas la Pol4 de *S. cerevisiae*. Esto no es de extrañar teniendo en cuenta que los análisis de comparación de secuencias proteicas y ARN ribosómico muestran que la distancia evolutiva entre *S. pombe* y *S. cerevisiae* es casi tan grande como la distancia entre *S. pombe* y eucariotas superiores, estando más próxima evolutivamente a especies de hongos como *Neurospora crassa* o *Aspergillus nidulans* (Sipiczki, 1995).



Figura 7. Filogenia de SpPol4. Alineamiento múltiple de una región del sitio activo de polimerización de las ADN polimerasas de la familia X, que permite la identificación de distintos homólogos de la Pol4 de *S. pombe* en distintas especies. Los residuos invariantes entre los distintos miembros de la familia se indican en letra blanca sobre fondo negro. Los residuos idénticos respecto a SpPol4 se indican en negrita y los residuos conservados se indican en azul. Las abreviaturas utilizadas son: Sch.po., *Schizosaccharomyces pombe*; Pod.an., *Podospira anserina*; Neu.cr., *Neurospora crassa*; Cha.gl., *Chaetomium globosum*; Mag.gr., *Magnaporthe grisea*; Gib.ze., *Gibberella zeae*; Pyr.tr., *Pyrenophora tritici-repentis*; Pha.no., *Phaeosphaeria nodorum*; Scl.scl., *Sclerotinia sclerotiorum*; Asp.te., *Aspergillus terreus*; Asp.nid., *Aspergillus nidulans*; Asp.fu., *Aspergillus fumigatus*; Asp.nig., *Aspergillus niger*; Sac.ce., *Saccharomyces cerevisiae*; Hom.sa., *Homo sapiens*.

3. CLONAJE Y PURIFICACIÓN DE LA ADN POLIMERASA 4 DE *S. pombe*

El marco de lectura abierto SPAC2F.06c de *S. pombe* se introdujo en el vector de expresión pDS473a, dando lugar a una construcción denominada pDS473a-SpPol4. El vector pDS473a permite un nivel alto de expresión en células de *S. pombe* de

proteína recombinante fusionada a *gluthathion* S-transferasa (GST) en su N-terminal. La expresión de la proteína recombinante está regulada por el promotor *nmt1*, de tal forma que la presencia de tiamina en el medio de cultivo reprime la expresión del promotor; al eliminar la tiamina del medio se activa el promotor permitiendo la expresión del gen de interés (Forsburg & Sherman, 1997).

La construcción pDS473a-*SpPol4* se utilizó para transformar células de *S. pombe* *pol4Δ::KanMX* utilizando el método de acetato de litio (ver Materiales y Métodos). La proteína recombinante fusionada a GST se purificó por cromatografía de afinidad utilizando *Gluthathion-Sepharosa* como se explica en Materiales y Métodos. A partir de las fracciones obtenidas en el último paso de la purificación, se identificó en un gel del 10% poli(acrilamida)-SDS teñido con azul de Coomassie un polipéptido que migra en la posición esperada para la proteína recombinante, aproximadamente 84 kDa (Figura 8). La *SpPol4* recombinante se purificó junto con una serie de productos de menor tamaño detectables mediante *western-blot* por el anticuerpo monoclonal α -GST. Estos productos probablemente corresponden a productos de degradación derivados de la expresión o productos de síntesis abortiva de la proteína recombinante. Estos productos secundarios presentan un tamaño de entre 5 y 25 kDa correspondientes al N-terminal de *SpPol4*, BRCT y el dominio S/P (excluyendo la estructura básica tipo Pol β), fusionados a la proteína GST, de unos 27 kDa de peso molecular. La *SpPol4* recombinante completa se obtuvo en forma soluble con un rendimiento mucho mayor que los productos de menor tamaño. Por lo dicho anteriormente, no habría interferencia de estos productos secundarios en los ensayos de actividad.

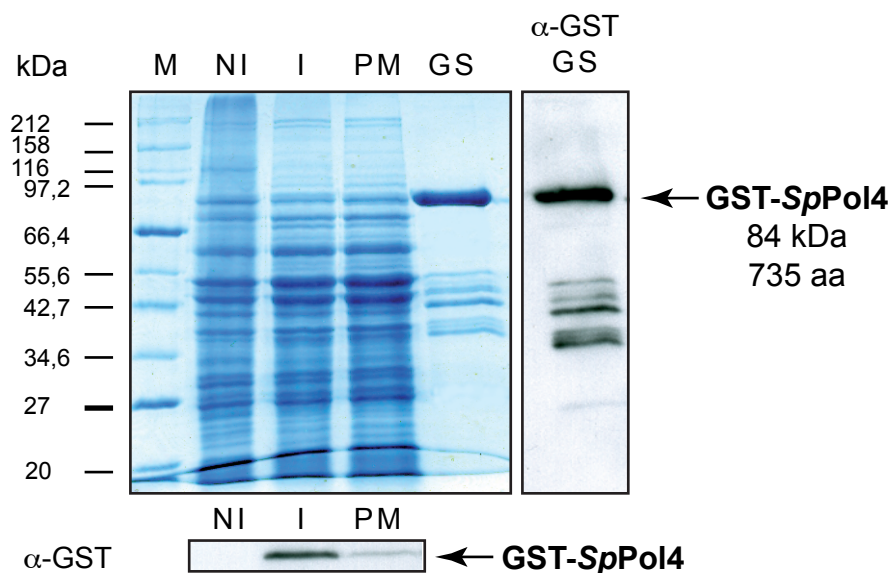


Figura 8. Purificación de la *SpPol4* recombinante en células de *S. pombe* *pol4Δ::KanMX*. Tinción con azul de Coomassie y *western-blot* con α -GST tras la separación electroforética en geles del 10% poli(acrilamida)-SDS de los diferentes extractos de células de *S. pombe* transformadas con el plásmido pDS473a-*SpPol4*. La sobre-expresión de *SpPol4* se observa en el *western-blot* del extracto total inducido (I), mientras que esta es ausente en el extracto no inducido (NI). GST-*SpPol4* se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas de *Gluthathion-Sepharosa* (GS), tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. La débil señal observada por *western-blot* en la fracción correspondiente al paso de muestra (PM) indicó que la mayor parte de la proteína recombinante expresada se había unido a la columna de *Gluthathion-Sepharosa*. La movilidad electroforética de la proteína sobre-producida se corresponde con el peso molecular esperado de la GST-*SpPol4* (aproximadamente 84 kDa), de acuerdo con el marcador de pesos moleculares (M).

4. *SpPOL4* TIENE UNA EXPRESIÓN NUCLEAR

Un aspecto importante de la expresión de *SpPol4* es si está dirigida al núcleo o a la mitocondria, puesto que ambas posibilidades son compatibles con una función en replicación o reparación del ADN. Para ello, se introdujo el gen de *SpPol4* en el vector de expresión de *S. pombe* pREP41GFP/EGFP N, el cual permite la expresión en células de *S. pombe* de proteína recombinante fusionada a la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP) en su N-terminal. La expresión de la proteína recombinante está regulada por el promotor *nmt1*, de tal forma que la presencia de tiamina en el medio de cultivo reprime la expresión del promotor, pero al eliminar la tiamina del medio se activa el promotor permitiendo la expresión del gen de interés (Craven *et al.*, 1998). La construcción pREP41 GFP/EGFP N-*SpPol4* se utilizó para transformar células de *S. pombe* *pol4Δ::KanMX* utilizando el método de acetato de litio (ver Materiales y Métodos). Como se observa por microscopía de fluorescencia en la **figura 9**, la expresión de la proteína recombinante fue dirigida mayoritariamente al núcleo.

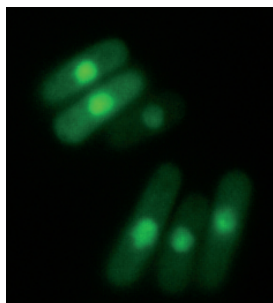


Figura 9. *SpPol4* tiene una expresión nuclear. Análisis de la fluorescencia conferida por la proteína verde fluorescente (GFP) a células de *S. pombe* *pol4Δ::KanMX* transformadas con el plásmido pREP41GFP/EGFP N-*SpPol4*, el cual expresa la proteína recombinante GFP-*SpPol4* bajo el control del promotor *nmt*. En ausencia de tiamina en el medio de cultivo, la proteína recombinante GFP-*SpPol4* se localiza mayoritariamente en el núcleo celular.

5. ACTIVIDAD ADN POLIMERASA INTRÍNSECA A *SpPOL4*

Para comprobar la capacidad de polimerización de la proteína purificada se realizó un ensayo de actividad de polimerización utilizando como molde ADN heteropolimérico activado (ADN de timo de ternera digerido con DNasa I), dCTP marcado radiativamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$) a baja concentración, los cuatro desoxinucleótidos no marcados a alta concentración e iones activadores Mg^{2+} o Mn^{2+} , como se explica en Materiales y Métodos. En estas condiciones se favorecería la incorporación, complementaria o no, de nucleótidos por desoxinucleotidiltransferasas (independientes de ADN molde) y por ADN polimerasas dependientes de molde carentes de actividad correctora de errores y de baja fidelidad de síntesis. Como muestra la **figura 10**, la fracción purificada era capaz de incorporar dNTP (medida de la incorporación de nucleótido marcado) en presencia de iones Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores, si bien la eficiencia catalítica fue aproximadamente 10 veces mayor en presencia de iones Mn^{2+} en lugar de iones Mg^{2+} . Por lo tanto, la capacidad de polimerización de SPAC2F7.06c observada en el ensayo es compatible con un papel *in vivo* como ADN polimerasa. Asimismo, SPAC2F7.06c codificaría una ADN polimerasa de 506 aminoácidos perteneciente a la familia X, a la que nos referiremos como *SpPol4*.

Como control de especificidad (para descartar que la actividad detectada pudiera deberse a posibles contaminantes de la purificación) se llevó a cabo una purificación en paralelo de un mutante catalíticamente inactivo, *SpPol4*^{D355A/D357A}, que contiene dos de los tres aspárticos catalíticos, Asp355 y Asp357, mutados a alanina. Este mutante se obtuvo mediante mutagénesis dirigida para posteriormente, expresarse y purificarse

siguiendo el protocolo de la proteína GST-*SpPol4* *wild-type* (ver Materiales y Métodos). No se detectó capacidad de polimerización alguna para la proteína *SpPol4*^{D355A/D357A} purificada (Figura 10).

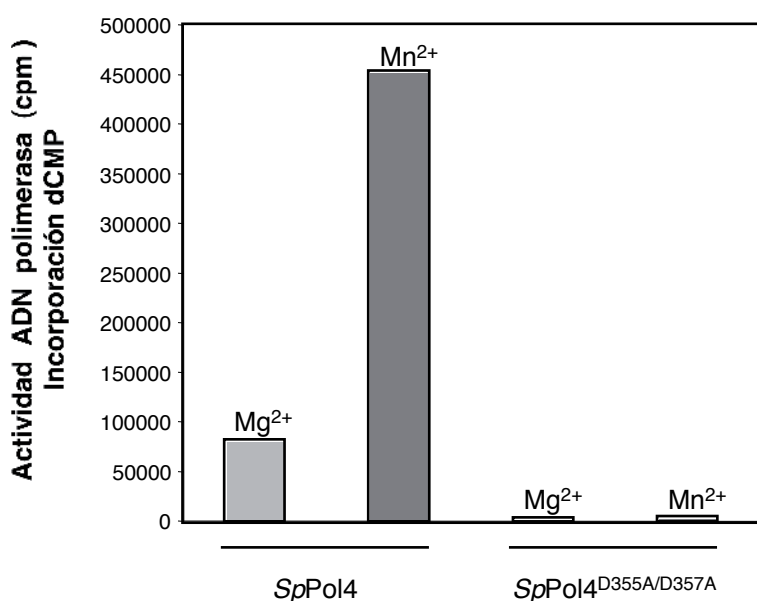


Figura 10. Actividad ADN polimerasa asociada a GST-*SpPol4*. Gráfica correspondiente a un ensayo de polimerización (marcaje [α -³²P]dCTP) en ADN activado de timo de ternera (descrito en Materiales y Métodos) llevado a cabo con 250 nM de la proteína recombinante purificada GST-*SpPol4* y un mutante catalíticamente inactivo GST-*SpPol4*^{D355A/D357A}, en presencia de $MgCl_2$ (10 mM) y $MnCl_2$ (1 mM) como fuentes de metales activadores de la reacción de polimerización. La actividad ADN polimerasa, expresada como incorporación de dCMP, fue cuantificada tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos.

6. *SpPOL4* CARECE DE ACTIVIDAD 3'→5' EXONUCLEASA

Una característica distintiva de las ADN polimerasas replicativas es su capacidad correctora de errores o actividad 3'→5' exonucleasa. El sitio activo de la actividad 3'→5' exonucleasa presenta tres motivos de estructura primaria denominados ExoI, ExoII y ExoIII (Bernad *et al.*, 1989). Dichos motivos no pudieron ser identificados en la polimerasa *SpPol4*, sugiriendo que, al igual que el resto de miembros de la familia X de ADN polimerasas, *SpPol4* carecería de actividad 3'→5' exonucleasa. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron ensayos específicos de exonucleasa utilizando tanto un oligonucleótido de cadena sencilla como un sustrato molde/cebador. Después de 30 minutos de incubación a 30°C, no se observó ninguna actividad nucleolítica de *SpPol4* en ambos sustratos, lo que demostraba que *SpPol4* no presenta actividad 3'→5' exonucleasa (datos no mostrados).

7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *SpPOL4*

7.1. Análisis de la procesividad de *SpPol4*

La procesividad de una ADN polimerasa es la capacidad de realizar un elevado número de ciclos de reacción por cada proceso de unión entre la polimerasa y el extremo 3' cebador. Para ello, se requiere una elevada afinidad de unión al ADN y una elevada velocidad de reacción, presentando una inserción eficiente del nucleótido. La procesividad es una característica común de las ADN polimerasas relacionadas con la síntesis de ADN, tales como las ADN polimerasas replicativas, capacitadas para realizar una síntesis extensiva. Por el contrario, las enzimas encargadas de reparar el ADN normalmente presentan interacciones más débiles con el ADN e incorporan nucleótidos de una forma más lenta, por lo que sintetizan el ADN de una forma

distributiva con frecuentes disociaciones. La polimerización distributiva es una característica común de las ADN polimerasas de la familia X como Pol β (Chang, 1975), Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2002), Pol μ (Ruiz *et al.*, 2003), TdT (Boulé *et al.*, 2001) y ScPol4 (Prasad *et al.*, 1993).

Para estudiar la procesividad de SpPol4 se analizó el patrón de extensión de moléculas de ADN molde/cebador mediante un ensayo de polimerización en el que se utilizan concentraciones decrecientes de enzima. En estas condiciones, la extensión del cebador por una polimerasa distributiva será dependiente de la relación enzima/ADN, decreciendo la longitud del producto al disminuir la relación. Por el contrario, en el caso de una polimerasa procesiva, la extensión del cebador es independiente de la relación enzima/ADN. Como se muestra en la **figura 11**, SpPol4 se comportó como una polimerasa distributiva, disminuyendo la longitud del producto extendido paralelamente a la relación de enzima/ADN de acuerdo con un patrón de polimerización distributiva. De estos datos podemos deducir que SpPol4 es una polimerasa distributiva adecuada para la síntesis de tramos cortos de ADN, aunque no se puede descartar que este comportamiento pueda ser modulado *in vivo* por proteínas accesorias.

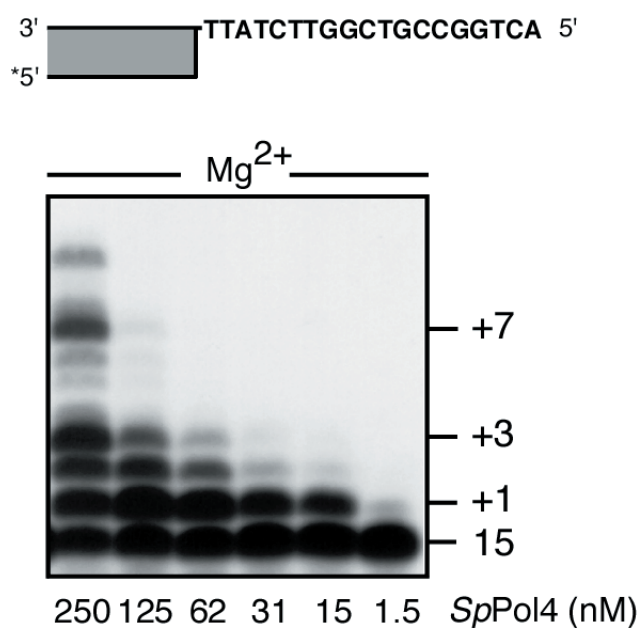


Figura 11. Polimerización distributiva de SpPol4. El esquema representa el sustrato de ADN molde/cebador. El cebador está marcado en su extremo 5' (*) (ver Materiales y Métodos). La reacción de polimerización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 2 mM de MgCl₂, usando 100 μM dNTPs, y disminuyendo las cantidades de SpPol4 desde 250 a 1.5 nM. Después de una incubación de 30 minutos a 30°C, la extensión del cebador se analizó en un gel de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. La movilidad del cebador no extendido (15) y de la extensión de 1 nucleótido (+1), 2 nucleótidos (+2) y 7 nucleótidos (+7) se indica en la radiografía.

7.2. Análisis de la afinidad de unión de SpPol4 al ADN

Como paso previo a la polimerización catalizada por una ADN polimerasa es necesaria la formación de un complejo binario entre la proteína y el ADN. Para analizar la afinidad de unión al ADN de SpPol4, se llevó a cabo una serie de ensayos de retraso de la movilidad electroforética (EMSA) de los complejos ADN-proteína en geles de poliacrilamida utilizando diferentes moléculas de ADN (**Figura 12.A**) y Mg²⁺ como cofactor. Los sustratos seleccionados basándose en la preferencia descrita para Pol β (Singhal & Wilson, 1993) y Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2002), fueron moléculas de ADN de doble cadena con huecos de pequeño tamaño (menos de 10 nucleótidos). La proteína purificada SpPol4 fué capaz de catalizar la incorporación de dNTPs muy eficientemente y de una forma dependiente de dosis tanto en un sustrato de ADN molde/cebador (datos no mostrados) como en un sustrato que contenía un hueco de un único nucleótido (**Figura 12.B**). Se observó un incremento significativo, unas 10

veces, de la capacidad de polimerización cuando en el 5' del hueco se encontraba un grupo fosfato en lugar de un grupo hidroxilo (**Figura 12.B**). Por lo tanto, *SpPol4* tiene preferencia por sustratos de ADN que presenten huecos de un nucleótido y un grupo fosfato en el 5' del hueco, propiedades compatibles con una función en reparación del ADN.

En *Polβ* y *Polλ*, la presencia del dominio de 8 kDa incrementa la procesividad de estas polimerasas en sustratos que contienen un 5' fosfato (Prasad *et al.*, 1994; Aravind & Koonin, 1999; Hübscher *et al.*, 2002; García-Díaz *et al.*, 2004). *SpPol4* presenta un dominio de 8 kDa y, como hemos visto anteriormente, se estimula en presencia de un grupo 5' fosfato en sustratos de ADN con un hueco de un nucleótido. Por ello, se evaluó si esta estimulación es debida a diferencias en la capacidad de unión al ADN, siendo un paso previo a la unión del nucleótido y la catálisis. Así, se demuestra que la formación de un complejo estable *SpPol4*/ADN, analizado por EMSA, ocurre a baja concentración de enzima cuando el ADN presenta un grupo fosfato en el 5' del hueco (**Figura 12.C**). Incluso, la afinidad de *SpPol4* por el fosfato en 5' es tan grande que si eliminamos el cebador, *SpPol4* se une a la molécula casi con la misma eficiencia (datos mostrados en el capítulo III, **figura 28**).

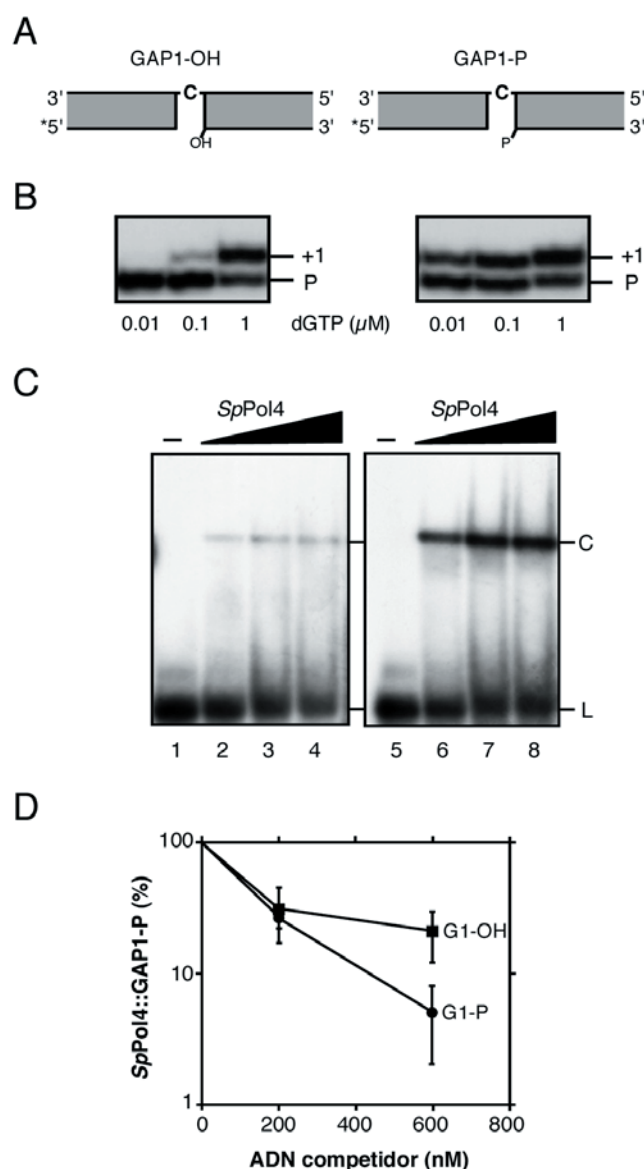


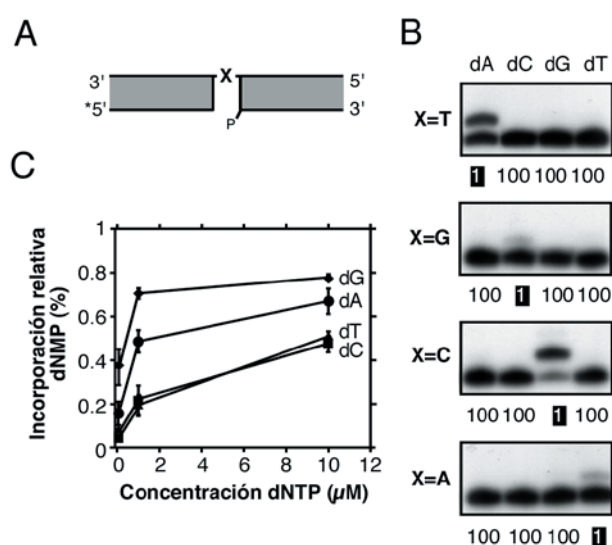
Figura 12. Síntesis de ADN en una molécula de doble cadena con un hueco de un único nucleótido y preferencias por sustrato de *SpPol4*. (A) Esquema de los dos tipos de moléculas utilizadas: ADN de doble cadena con un hueco de un nucleótido (GAP1-OH) y un hueco de un nucleótido con un grupo fosfato en el 5' del hueco (GAP1-P). Cebadores marcados (*) y los grupos hidroxilo (OH) y fosfato (P) en 5' están indicados. (B) Síntesis de ADN de *SpPol4* en las estructuras de ADN descritas arriba. Las reacciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos utilizando 125 nM de *SpPol4* y la concentración indicada de dGTP. La extensión del cebador se analizó en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. La movilidad del cebador sin extender (P) y la extensión de 1 nucleótido (+1) se indican en la radiografía. (C) Capacidad de unión al ADN de *SpPol4* en moléculas en las que falta un nucleótido. EMSA se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos en ausencia de enzima (carriles 1 y 5), utilizando 250 nM (carriles 2 y 6), 600 nM (carriles 3 y 7) y 1.2 μM (carriles 4 y 8) de *SpPol4*. La formación de los complejos *SpPol4*-ADN se analizó en geles de electroforesis nativos 4% poliacrilamida (80:1; monómero/bis). En la radiografía se indican las movilidades del ADN libre (L) y de los complejos *SpPol4*/ADN (C). (D) Análisis de competición de la unión de *SpPol4* al sustrato de ADN GAP1-P. EMSA se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos, pero utilizando las cantidades indicadas de GAP1-P o GAP1-OH como competidor de ADN no marcado. Los valores de la gráfica representan el porcentaje de GAP1-P marcado que queda unido a *SpPol4* después de la competición, siendo la media de cuatro experimentos diferentes.

Para analizar el efecto estabilizador del 5' fosfato en el ADN, se realizó un ensayo de competición, como se describe en Materiales y Métodos. Como era de esperar, la cantidad de complejos *SpPol4*/GAP1-P (marcados) formados en un paso previo disminuyen progresivamente cuando se incrementa el competidor de ADN no marcado (tanto en presencia como ausencia de un grupo 5' fosfato), siendo mucho mayor la competición con un GAP1-P no marcado (**Figura 12.D**).

Analizando todos estos resultados en conjunto, podemos decir que *SpPol4* se une estable y preferentemente a un hueco en el ADN que contenga un grupo fosfato en 5'.

7.3. Análisis de la fidelidad de *SpPol4*

Para evaluar la capacidad de *SpPol4* para discriminar entre los cuatro desoxinucleótidos cuando cataliza la síntesis dirigida por molde, se utilizaron como sustratos cuatro moléculas de ADN de doble cadena que contenían un hueco de un único nucleótido con cada una de las cuatro bases en el molde y un grupo fosfato en el 5' del hueco, ya que como se ha demostrado es el sustrato óptimo del enzima, como se representa en la **figura 13.A**. Para cada sustrato, se utilizaron los cuatro dNTPs, uno complementario al molde y los otros tres no complementarios, ensayados individualmente a diferentes concentraciones. Como se muestra en la **figura 13.B**, *SpPol4* incorpora preferentemente el nucleótido complementario a la base del molde, incluso cuando los nucleótidos no complementarios están a una concentración 100 veces mayor. Este resultado indica que la síntesis de ADN llevada a cabo por *SpPol4* es dirigida por molde siguiendo las reglas de apareamiento de Watson-Crick. Además, se observa una preferencia por la incorporación de purinas: dG>>dA>dT>dC. Para evaluar las diferentes preferencias de *SpPol4* por el nucleótido, se realizó una cuantificación de la incorporación del dNMP complementario para las cuatro moléculas a diferentes concentraciones de dNTPs. Los valores de la gráfica de la **figura 13.C** representan la ratio entre la cantidad de cebador extendido y el cebador total, siendo la media de cuatro experimentos independientes. Los valores obtenidos indican que la base guanina se incorpora 2.4 veces mejor que la base adenina, 5.3 veces mejor que la base timidina y 8.2 veces mejor que la base citosina.



7.4. Incorporación de ribonucleótidos por *SpPol4*

La mayoría de las ADN polimerasas seleccionan la naturaleza del azúcar del nucleótido de una forma muy exquisita, prefiriendo incorporar desoxinucleótidos a ribonucleótidos en el ADN. En general, en las ADN polimerasas replicativas, la discriminación del azúcar parece depender de un único aminoácido del sitio activo, el cual actúa de barrera estérica bloqueando el 2'-hidroxilo del rNTP entrante (Joyce, 1997). Sin embargo, la capacidad de incorporar rNTPs así como dNTPs, ha sido descrita para otros miembros de ADN polimerasas de la familia X de mamíferos; TdT (Boulé *et al.*, 2001), Polμ (Nick McElhinny & Ramsden, 2003; Ruiz, *et al.*, 2003) y ScPol4 (Bebenek *et al.*, 2005), no estando presente en otros miembros de la misma familia.



Figura 14. Alineamiento múltiple de la región aminoacídica implicada en la discriminación de azúcar de los miembros de la familia X. Los números entre barras indican la posición aminoacídica relativa al extremo aminoterminal de cada polimerasa. De acuerdo con los datos estructurales de Polβ (Pelletier *et al.*, 1994), esta región conecta los subdominios *palma* y *pulgar*, y contiene uno de los tres aspárticos que actúan como ligandos del metal (marcado con un asterisco debajo del alineamiento). Los residuos invariantes entre los diferentes miembros de la familia X (Oliveros *et al.*, 1997) están indicados en letra blanca sobre fondo negro. Los dos residuos implicados en la discriminación del azúcar están enmarcados por una caja blanca. Las abreviaturas utilizadas son: Mus mu., *Mus musculus*; Bos ta., *Bos taurus*; Gal.ga., *Gallus gallus*; Xen.la., *Xenopus laevis*; Mon.do., *Monodelphis domestica*; Amb.me., *Ambystoma mexicanum*; Onc.my., *Oncorhynchus mykiss*; Sch.po., *Schizosaccharomyces pombe*; Rat.no., *Rattus norvegicus*; Sac.ce., *Saccharomyces cerevisiae*; Cri.fa., *Crithidia fasciculata*; Bac.su., *Bacillus subtilis*; Met.th., *Methanothermobacter thermautotrophicus*; Aqu.ae., *Aquifex aeolicus* y The.aq., *Thermus aquaticus*.

Como se había descrito previamente, Polβ posee tres residuos que interaccionan mediante enlaces de van der Waals con los carbonos C2' y C3' del anillo del azúcar del nucleótido entrante: Tyr271, Phe272 y Gly274 (Pelletier *et al.*, 1994). Estos residuos están localizados en el subdominio *pulgar*, y participarían en la discriminación del azúcar del nucleótido entrante (Pelletier *et al.*, 1996). Al alinear las secuencias aminoacídicas de la región correspondiente a los residuos implicados en la unión al nucleótido de distintos miembros de la familia X (Figura 14), se observó que la Gly274 de Polβ está conservada en todas las ADN polimerasas de la familia X, incluidas TdT y Polμ, no

siendo así en el caso de la Tyr271 y Phe272. El residuo Phe272 de Pol β está conservado en la Pol λ humana y murina, en las PolXs de *Crithidia fasciculata*, de *Bacillus subtilis*, de las arqueas *Methanothermobacter thermautotrophicus* y *Aquifex aeolicus*, y del virus de la peste porcina africana (VPPA). En otros casos, este residuo está sustituido por un residuo conservativo (Tyr) en la Pol4 de *Saccharomyces cerevisiae* o por un residuo no conservativo (Leu) en la PolX de *Thermus aquaticus*. Resalta el hecho de que este residuo de Phe esté sustituido por Trp en todas las TdT y Pol μ de diferentes especies, así como en la Pol4 de *S. pombe*. Por otra parte, el residuo Tyr271 de Pol β es invariante en la Pol λ humana y murina y en las PolXs de arqueobacterias, y está sustituido por un residuo aromático diferente (His) en la Pol4 de *S. cerevisiae* y en las PolXs de *Bacillus subtilis* y VPPA, o por un residuo no conservativo (Thr) en la PolX de *C. fasciculata*. Por el contrario, esta Tyr271 está sustituida por un residuo de Gly, mucho más pequeño, invariante en todas las TdT y Pol μ de diferentes especies, así como en la Pol4 de *S. pombe*. Se ha demostrado que la capacidad de insertar ribonucleótidos por la Pol μ humana depende mayoritariamente de este residuo de Gly (Ruiz *et al.*, 2003).

7.4.1. *Sp*Pol4 inserta rNTPs y dNTPs con la misma eficiencia

Como se ha descrito previamente, en *Sp*Pol4 están conservados los residuos equivalentes de Pol μ en el sitio activo de discriminación del azúcar, por lo que se analizó la capacidad de *Sp*Pol4 para incorporar ribonucleótidos. Utilizando los mismos cuatro sustratos usados en la **figura 13.A**, se dedujo que *Sp*Pol4 incorpora rNTPs a una cadena de ADN (**Figura 15**) con la misma eficiencia que incorpora los dNTPs, mostrando el mismo patrón de preferencia por purinas (**comparar figuras 13.B y 15.C**). Los valores obtenidos indican que el rGTP se incorpora 1.5 veces mejor que el rATP, 7.7 veces mejor que el rCTP y 10 veces mejor que el rUTP.

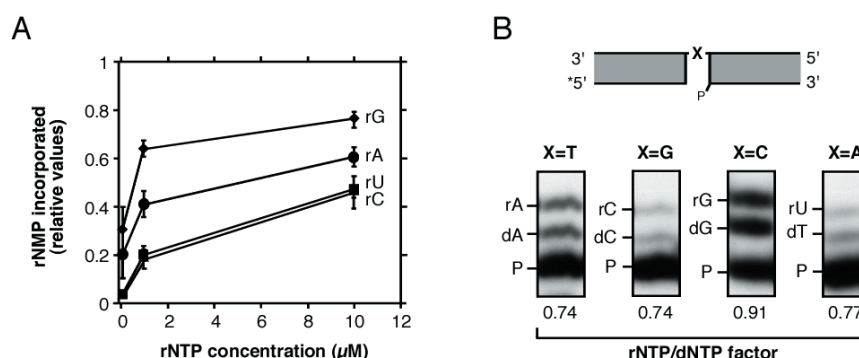


Figura 15. *Sp*Pol4 no muestra discriminación por el azúcar. (A) *Sp*Pol4 inserta rNTPs eficientemente. El ensayo, descrito en la figura 13, evalúa la incorporación del rNMP complementario en las cuatro moléculas, a diferentes concentraciones de rNTP. La gráfica representa la proporción entre la cantidad de cebador extendido frente al cebador total, siendo la media de cuatro experimentos independientes. **(B) No discriminación del azúcar por *Sp*Pol4.** Las cuatro moléculas de ADN utilizadas descritas en la figura 13, se diferencian en la base X del molde. En este ensayo de competición, se mezclan los dos nucleótidos complementarios (rNTP+dNTP) a una concentración de 100 nM. La reacción se lleva a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando 125 nM *Sp*Pol4. La movilidad del cebador (P) y de los cebadores extendidos por dNTP (dN) y rNTP (rN) se analizan en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. El factor de selección del azúcar se expresa como la relación entre la cantidad de cebador extendido con rNMP frente a dNMP.

Se utilizó un ensayo de competición, descrito previamente en Boulé *et al.* (2001), con ambos azúcares (ribosa y desoxirribosa) suministrados simultáneamente. Como rNTP y dNTP tienen diferentes pesos moleculares, los cebadores extendidos con un nucleótido (+1) pueden separarse fácilmente por electroforesis y cuantificarse. El factor de selección del azúcar se calcula como la proporción entre la cantidad de cebador

extendido con rNMP frente a dNMP. Independientemente de la naturaleza de la base, el factor de selección del azúcar obtenido para *SpPol4* es muy similar y próximo a 1 (0.74-0.91), no mostrando discriminación entre rNTPs y dNTPs (**Figura 15.C**).

7.4.2. *SpPol4* intercala rNTPs en el ADN que inhiben la polimerización

A la vista de la capacidad de *SpPol4* de incorporar dNTPs y rNTPs, analizamos su incorporación en cadenas de ADN *in vitro* en condiciones que reproducían las condiciones *in vivo*, donde se ha descrito que existe una concentración de rNTPs 10 veces mayor que la de dNTPs (Meuth, 1984). En estas condiciones, la inserción de rNTPs durante la polimerización catalizada por *SpPol4* produce una inhibición en la polimerización (**Figura 16**), siendo incapaz de ser elongados tanto por dNTPs (carriles 10, 11 y 12) como por rNTPs (carriles 6, 7, 8 y 9). Sin embargo, a pesar del efecto inhibitorio, es posible que durante la polimerización llevada a cabo por *SpPol4* se pueda intercalar rNTPs de manera indiscriminada en el ADN, los cuales podrían tener importancia de no ser reparados eficientemente por los sistemas de reparación celulares.

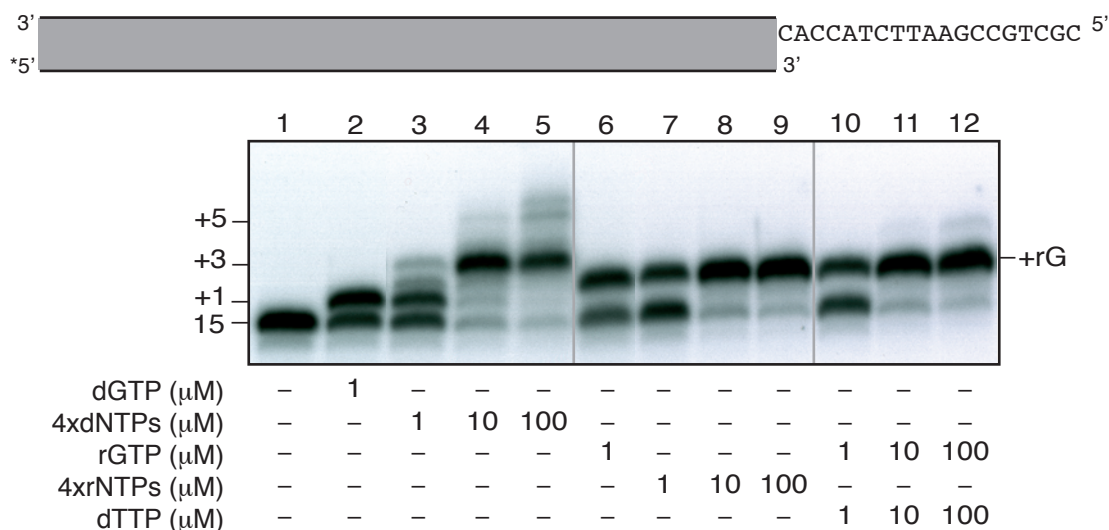


Figura 15. La inserción de rNTPs por *SpPol4* inhibe la polimerización de ADN. El esquema representa el sustrato de ADN molde/cebador. El cebador está marcado en su extremo 5' (*) (ver Materiales y Métodos). La reacción de polimerización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 2 mM de MgCl₂, usando 100 nM de *SpPol4*, y las concentraciones indicadas de dNTPs y rNTPs. Después de una incubación de 30 minutos a 30°C, la extensión del cebador se analizó en un gel de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. La movilidad del cebador no extendido (15) y de la extensión de 1 desoxinucleótido (+1), 2 desoxinucleótidos (+2), 6 desoxinucleótidos (+6) y 1 ribonucleótido (+rG) se indican en la radiografía.

7.4.3. La glicina 434 de *SpPol4* es esencial en la discriminación del azúcar

El cambio Gly433 a Tyr de Polμ (igual que Polβ) si bien supuso una reducción de actividad en presencia de dNTPs, produjo la pérdida completa de la capacidad de insertar rNTPs, deduciéndose por ello que el responsable de la ausencia de discriminación del azúcar por Polμ es el residuo Gly433 (Ruiz *et al.*, 2003). De acuerdo con el alineamiento de aminoácidos de la **figura 14**, se decidió mutar el residuo Gly434 de *SpPol4* a Tyr mediante mutagénesis dirigida (ver Materiales y Métodos) y analizar su capacidad de polimerización y el nivel de discriminación entre dNTPs y rNTPs de la proteína mutante. Esta proteína mutante se expresó y purificó de acuerdo con el

protocolo utilizado para la proteína GST-*SpPol4* *wild-type* (ver Materiales y Métodos). Como refleja la **figura 17**, la habilidad de incorporar rNTPs por el mutante *SpPol4*^{G434Y} disminuyó drásticamente con respecto a la proteína *SpPol4* *wild-type*. Por otro lado, hay que resaltar que el mutante *SpPol4*^{G434Y} presenta una disminución de la eficiencia de polimerización de dNTPs en relación con la proteína *wild-type*, no viéndose afectada su afinidad por el ADN (datos no mostrados), lo que sugiere que este residuo también es importante para la óptima actividad catalítica de la enzima.

3' TGAAGTCCCTCTCGACCAAGAACCTGCACAGA 5'
 *5' ACTTCAGGGAGAGCTG₃ TTCTTGGACGTGTCT

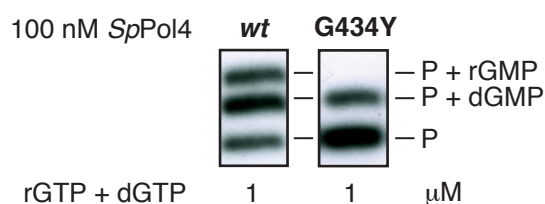


Figura 17. La ausencia de discriminación del azúcar por *SpPol4* reside en el residuo glicina 434. El esquema representa el sustrato de ADN de doble cadena que contiene un hueco de un único nucleótido. El cebador está marcado en su extremo 5' (*) (ver Materiales y Métodos). La reacción de polimerización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 2 mM de MgCl₂, usando 100 nM de *SpPol4* *wild-type* o *SpPol4*^{G434Y} y 1 μM de dGTP y rGTP simultáneamente. Después de una incubación de 30 minutos a 30°C, la relación entre los cebadores extendidos con dGMP y rGMP se analizó en un gel de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

7.5. *SpPol4* carece de actividad desoxinucleotidiltransferasa

Polμ, como TdT, presenta actividad desoxinucleotidiltransferasa (transferasa terminal), la cual es más intensa en presencia de iones Mn²⁺ como cofactor (Domínguez *et al.*, 2000). Esta actividad enzimática requiere una región del subdominio *palma* llamado *loop1*, el cual está ausente en *SpPol4*, Polβ y Polλ (**Figura 18.A**). Se ha demostrado que la eliminación del *loop1* en la Polμ humana elimina la actividad transferasa terminal (Nick McElhinny *et al.*, 2005; Juárez *et al.*, 2006). Esta actividad se puede determinar utilizando un homopolímero de ADN de cadena sencilla como cebador y cualquiera de los tres nucleótidos no complementarios a la secuencia del cebador. Utilizando como sustrato de ADN un homopolímero de cadena sencilla (oligonucleótido dT de 15 nucleótidos) marcado con ³²P en su extremo 5', en presencia de iones Mg²⁺ o Mn²⁺ como cofactores, *SpPol4* no presentó actividad transferasa terminal (**Figura 18.B**).

7.6. El dominio de 8 kDa

Una de las características estructurales distintivas de las ADN polimerasas de la familia X es la presencia, en el extremo N-terminal del dominio de polimerización, de una región muy conservada: el dominio de 8 kDa. Se trata de un dominio independiente, identificado originalmente en Polβ (Kumar *et al.*, 1990). Este dominio tiene asociadas diversas actividades y funciones. En Polβ, el dominio de 8 kDa contiene el centro activo de la actividad desoxirribosafosfato liasa (dRP liasa), encargada de la eliminación del residuo desoxirribosafosfato (dRP) generado durante la ruta de reparación por escisión de base (BER) (Matsumoto & Kim 1995). Asimismo, Polλ (García-Díaz *et al.*, 2001) y ScPol4 (Bebenek *et al.*, 2005) presentan actividad dRP liasa. Además, Polβ presenta otra actividad endonucleolítica denominada AP liasa, la cual genera una incisión en la cadena de ADN en el flanco 3' de un sitio abásico; cabe resaltar que esta actividad es 200 veces menos eficiente que la actividad dRP liasa (Prasad *et al.*, 1998a). Por otro lado, en todos los miembros de la familia X se ha demostrado que el dominio de 8 kDa cumple una importante función de unión al ADN, que le permite reconocer el extremo 5' fosfato recesivo de una rotura de ADN.

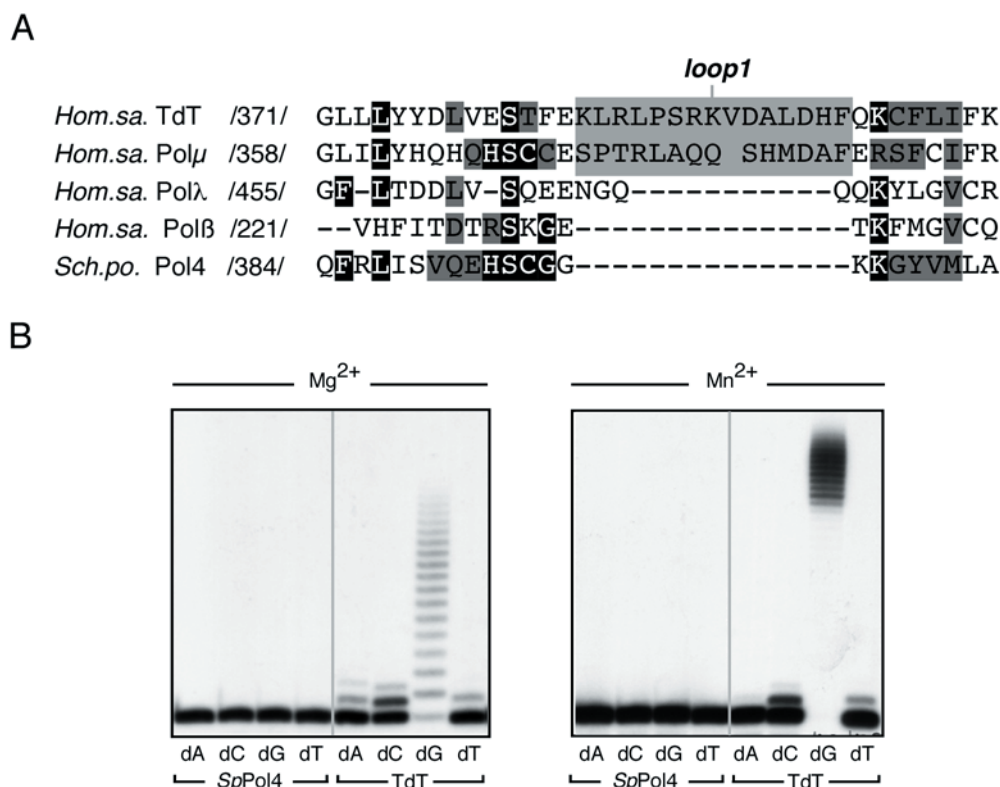


Figura 18. *SpPol4* no presenta actividad desoxinucleotidiltransferasa. (A) Alineamiento múltiple de la región de aminoácidos presumiblemente involucrada en la actividad transferasa terminal en la familia de las PolX. Los números entre barras indican la posición del aminoácido relativo al N-terminal de cada polimerasa. Se indican los aminoácidos invariantes (cajas negras con letras blancas) y los cambios conservativos, referidos a residuos de *SpPol4* (cajas grises oscuras). En una caja gris clara se indica una inserción (*loop1*) posiblemente involucrada en la actividad transferasa terminal. Las abreviaturas utilizadas son: Hom. sa., *Homo sapiens*; Sch. po., *Schizosaccharomyces pombe* y Sac. ce., *Saccharomyces cerevisiae*. (B) Actividad transferasa terminal en presencia de *SpPol4*. El ensayo se lleva a cabo utilizando un oligonucleótido dT de cadena sencilla de 15 nucleótidos marcado en 5', 2 mM $MgCl_2$ o 1 mM $MnCl_2$ como cofactores, 10 μ M de cada dNTP individualmente, y TdT (90 nM) o *SpPol4* (600 nM). Después de una incubación de 30 minutos a 30 °C, la extensión del oligo dT marcado en 5' se analiza en geles de 20% poliacrilamida-8M urea y posterior autorradiografía.

7.6.1. Actividad desoxirribosafosfato liasa

La actividad dRP liasa tiene lugar gracias a un mecanismo de β -eliminación a través de un intermediario en forma de base de *Schiff* y de manera independiente de metal (Prasad *et al.*, 1998a), siendo un paso esencial para el mecanismo de reparación de sitios abásicos durante la ruta de reparación por escisión de base (BER) (Sobol *et al.*, 1996).

El residuo aminoacídico crítico para la actividad dRP liasa está conservado en el dominio de 8 kDa de Polβ (Lys72) y Polλ (Lys312) (Prasad *et al.*, 1998b; García-Díaz *et al.*, 2001), indicados en la **figura 19.A**. Este residuo corresponde a la lisina catalítica que actúa como base de *Schiff* durante la β -eliminación del residuo desoxirribosafosfato (dRP). Como se muestra en la **figura 19.A**, Polμ y *SpPol4* carecen de esta lisina catalítica, y como se ha demostrado para Polμ (García-Díaz *et al.*, 2001), era probable que *SpPol4* estuviera desprovista de actividad dRP liasa.

Para evaluar la presencia de actividad dRP liasa en el dominio de 8 kDa de *SpPol4*, se empleó un sustrato de ADN de doble cadena de 34 pares de bases, el cual contenía un uracilo en la posición 16. Como se describe en Materiales y Métodos, la cadena que contiene el uracilo se marca en 3' con [α - 32 P]dCTP, para posteriormente hibridarse con

su cadena complementaria. Se trató el sustrato de ADN de doble cadena con uracil ADN glicosilasa (UDG) para eliminar el uracilo, dejando un sitio abásico que es sustrato de la AP endonucleasa humana (hAPE1), cuya actividad genera un corte flanqueado por un residuo dRP (ver esquema figura 19.A). Este sustrato se incubó en ausencia o presencia de Pol β , Pol λ y Pol μ . Como se puede observar en la figura 19.B, SpPol4 es capaz de eliminar el residuo dRP al igual que Pol β y Pol λ , reduciéndose el tamaño del sustrato marcado (mayor movilidad electroforética). Como control negativo de esta reacción se llevó Pol μ , que carece de actividad dRP liasa. Por lo tanto, SpPol4 presentó actividad dRP liasa aún careciendo del residuo de lisina conservado en Pol β y Pol λ .

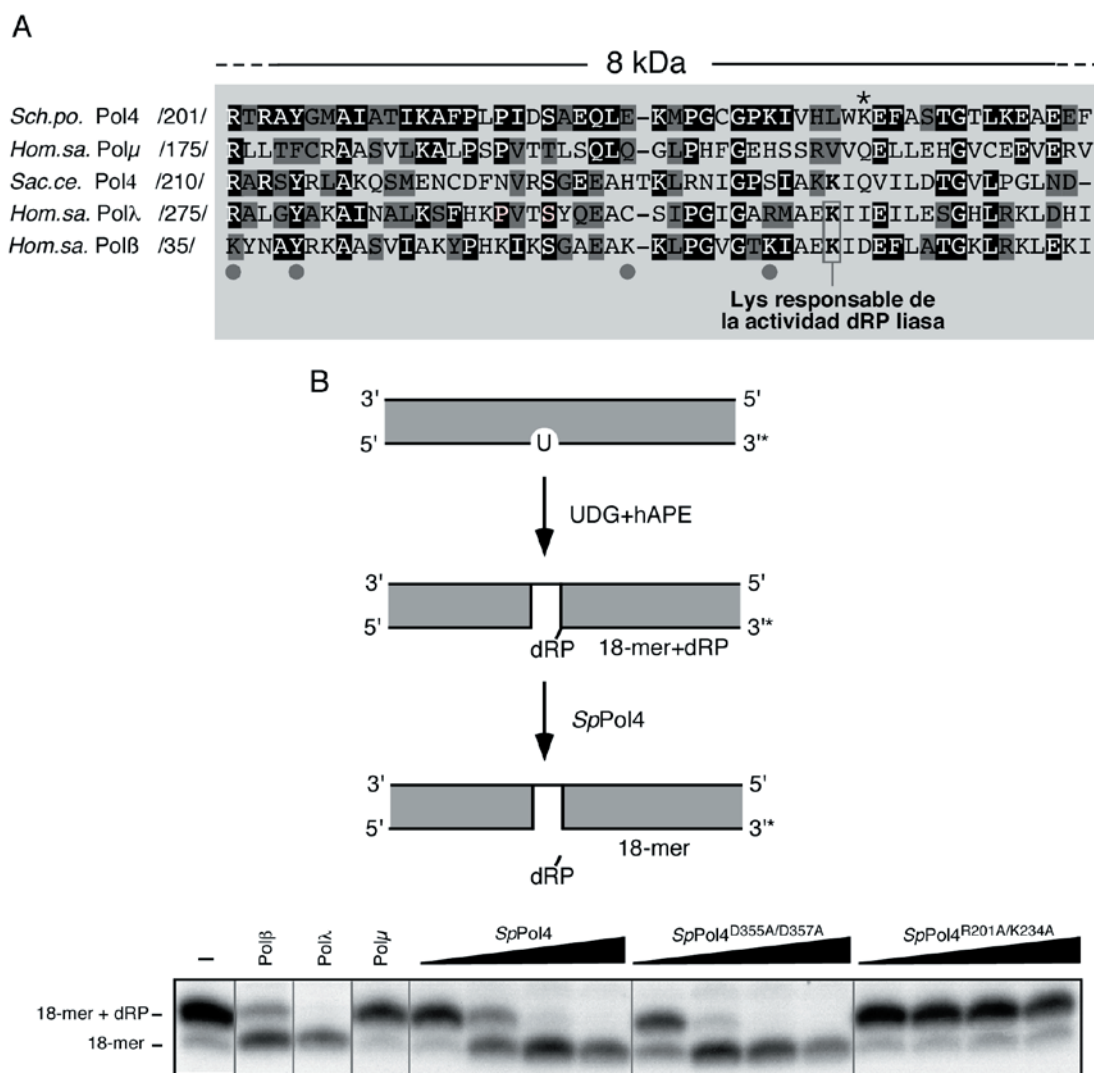


Figura 19. Caracterización de la actividad dRP liasa de SpPol4. (A) Alineamiento múltiple del dominio de 8 kDa de SpPol4 y otros miembros de la familia X. Los números entre barras indican la posición del aminoácido relativo al N-terminal de cada polimerasa. Los residuos relevantes para la actividad dRP liasa están marcados con puntos. Residuos esenciales o que pueden estar involucrados en la actividad dRP liasa están marcados en negrita. El asterisco indica la posición de la lisina de SpPol4 que podría corresponder a la lisina responsable de tal actividad en la Pol β humana. Se indican aminoácidos invariantes (cajas negras con letras blancas) y los cambios conservativos, referidos a residuos de SpPol4 (cajas grises oscuras). Las abreviaturas utilizadas son Hom. sa., *Homo sapiens*; Sch. po., *Schizosaccharomyces pombe* y Sac. ce., *Saccharomyces cerevisiae*. **(B)** Análisis in vivo de la reacción dRP liasa. El esquema muestra un ADN de cadena doble que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena, todo ello marcado en el extremo 3' (*). Después del tratamiento con UDG y hAPE, se obtiene un sustrato con un corte que contiene un residuo dRP (18 mer +dRP). Como se muestra en la radiografía, el residuo dRP se puede eliminar por la acción de las polimerasas humanas Pol β (500 nM), Pol λ (500 nM), SpPol4 y SpPol4^{D355A/D357A} (100, 250, 500 y 1000 nM), pero no por Pol μ (100 nM) y SpPol4^{R201A/K234A} (100, 250, 500 y 1000 nM). El producto de actividad dRP liasa (18 mer) se detecta después de una electroforesis desnaturalizante en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

7.6.2. *SpPol4* escinde grupos dRP a través de un mecanismo de β -eliminación

Como se ha dicho anteriormente, la actividad dRP liasa de Pol β y Pol λ tiene lugar gracias a un mecanismo de β -eliminación donde la lisina catalítica forma un intermedio de base de Schiff, el cual, en presencia de borohidruro sódico, se reduce dando lugar a un complejo covalente proteína-ADN (Piersen *et al.*, 1996). Para evaluar si la reacción catalizada por *SpPol4* transcurre por un mecanismo análogo, se llevó a cabo la reacción dRP liasa en presencia de borohidruro sódico. De este modo, si la reacción tiene lugar mediante la formación de una base de Schiff, la inclusión de borohidruro sódico en una reacción de dRP liasa debería permitir atrapar un complejo proteína-ADN tras la separación en un gel de poliacrilamida-SDS.

En la **figura 20** se observa que Pol β , Pol λ y *SpPol4*, producen una banda marcada de movilidad inferior al ADN libre, con un tamaño diferente para cada complejo polimerasa-ADN que son absolutamente dependiente de borohidruro sódico. Sin embargo, esta banda está ausente en la reacción correspondiente a Pol μ , lo cual es consistente con su falta de actividad dRP liasa. Por tanto, los datos sugieren que la *SpPol4* comparte un mecanismo de catálisis similar con la Pol β , Pol λ y otras enzimas con actividad dRP liasa.

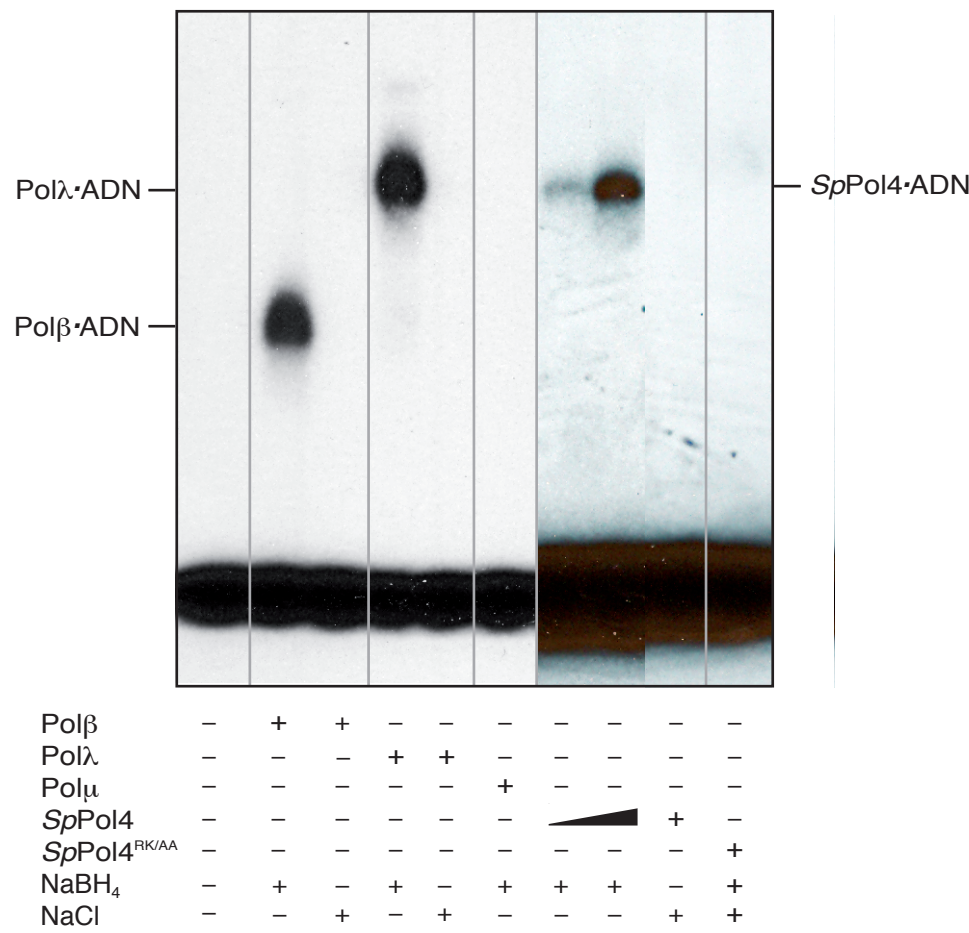


Figura 20. Reducción de un complejo covalente entre *SpPol4* y el ADN. Ensayo de reducción empleando borohidruro sódico (NaBH₄). La reacción se lleva a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando Pol β (250 nM), Pol λ (250 nM), Pol μ (250 nM), *SpPol4* (1000 y 1500 nM) y *SpPol4*^{R201A/K234A} (1500 nM). Según se indica, se añadieron a las reacciones 20 mM NaBH₄ o NaCl, incubándose 30 minutos en hielo. Los complejos proteína-ADN se detectan por autorradiografía tras la separación en un gel de poliacrilamida-SDS.

7.6.3. Análisis funcional del mutante *SpPol4*^{R201A/K234A}

Se han propuesto otros residuos que facilitan la eliminación del residuo desoxirribosafosfato (dRP) en Pol β (Lys35, Tyr39 y Lys68), indicados con puntos en la **figura 19.A**, los cuales están conservados en *SpPol4* (Arg201, Tyr205 y Lys234 respectivamente). Por lo tanto, decidimos mutar simultáneamente los residuos Arg201 y Lys234 de *SpPol4* a alanina mediante mutagénesis dirigida (ver Materiales y Métodos), con el fin de hallar los residuos implicados en la formación de la base de Schiff durante la catálisis de la eliminación de residuos dRP. Esta proteína mutante se expresó y purificó de acuerdo con el protocolo utilizado para la proteína GST-*SpPol4* *wild-type* (ver Materiales y Métodos). Como se esperaba, el mutante *SpPol4*^{R201A/K234A} presentó una actividad dRP liasa muy reducida (inferior al 10% de la actividad de la proteína *SpPol4* *wild-type*) (**Figura 19.B**). Asimismo, el mutante *SpPol4*^{R201A/K234A} no pudo ser atrapado empleando borohidruro sódico (**Figura 20**). Además, el mutante *SpPol4*^{R201A/K234A} tenía afectada la capacidad de unión al ADN (datos no mostrados), viéndose reducida su capacidad de polimerización en un sustrato molde/cebador a un 10% aproximadamente con respecto a la polimerasa *wild-type*. Estos datos sugieren que los residuos Arg201 y Lys234 cumplen una función importante en la unión al ADN, aparte de estar posiblemente implicados en la formación de la base de Schiff durante la catálisis de la eliminación de residuos dRP.

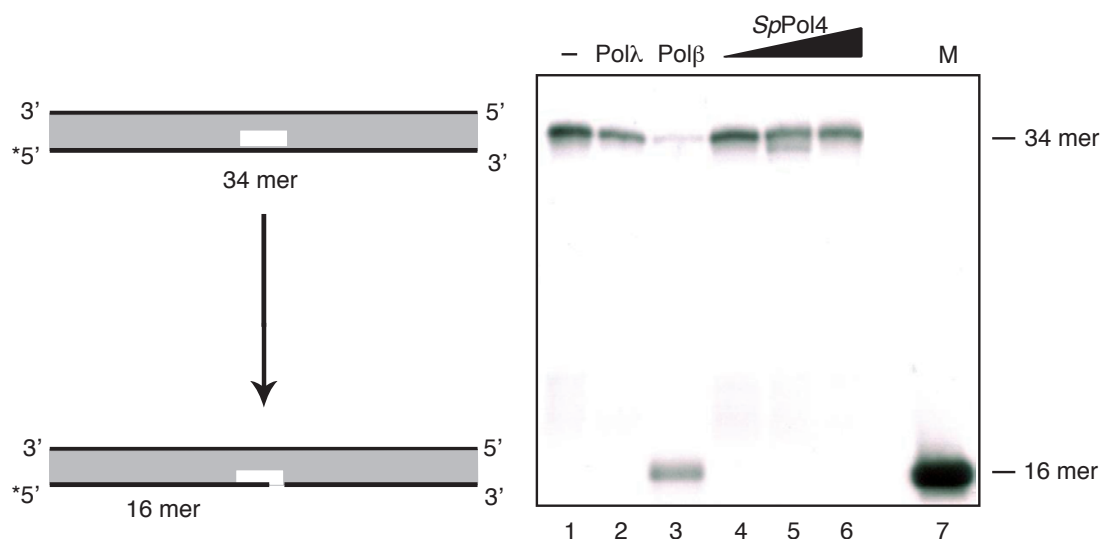


Figura 21. Ausencia de actividad AP liasa en *SpPol4*. El esquema muestra un ADN de cadena doble que contiene un sitio abásico en la posición 16 de la cadena, todo ello marcado en el extremo 5' (*). La reacción se lleva a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando Pol β (500 nM), Pol λ (500 nM) o *SpPol4* (500, 1000 y 2000 nM). Después de una incubación de 20 minutos a 37°C, el corte de la cadena marcada (34 nucleótidos) del sustrato por una actividad AP liasa genera un fragmento de 16 nucleótidos, los productos resultantes se analizan en geles de 20% poliácridamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

7.6.4. *SpPol4* carece de actividad AP liasa

Como se ha dicho anteriormente, Pol β presenta actividad AP liasa intrínseca. Esta actividad consiste en la capacidad de romper el enlace fosfodiéster en el flanco 3' de un sitio abásico que no ha sido procesado, es decir, que no ha sido sustrato de una AP endonucleasa la cual produce un corte en el flanco 5' de un sitio abásico (Prasad *et al.*, 1998a). Se ha propuesto que la actividad AP liasa y desoxirribosafosfato liasa (dRP liasa) presentan el mismo mecanismo de acción (Piersen *et al.*, 2000), sugiriendo la implicación de los mismos residuos catalíticos. Por ello, tras comprobar que *SpPol4*

presenta actividad dRP liasa, se analizó la presencia de actividad AP liasa asociada. Como se observa en la **figura 21**, *SpPol4* carece de actividad AP liasa al contrario que *Polβ*. Esta diferencia bioquímica entre ambas enzimas sugiere que ambas actividades podrían residir en distintos centros activos o no implicar necesariamente los mismos residuos.

II. Reparación por escisión de base

Como se demuestra en el capítulo anterior, el ortólogo de Pol β en *S. pombe*, SpPol4, también presenta actividad dRP liasa igual que Pol β (Prasad *et al.*, 1998a) y otros miembros de la familia X de ADN polimerasas como Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2001) y ScPol4 (Bebenek *et al.*, 2005). Esta característica de SpPol4 sugiere su participación en el mecanismo de reparación por escisión de base (BER) de *S. pombe* dada la importancia *in vivo* que tiene la actividad dRP liasa de Pol β en el BER de mamíferos.

Para estudiar el posible papel de SpPol4 en BER se realizaron dos aproximaciones diferentes. En primer lugar, se realizó un análisis *in vitro* en distintos sustratos de ADN aportando, por un lado, los distintos enzimas implicados en cada paso de BER o extractos celulares totales carentes de SpPol4 y, por otro lado, ensayos de actividad con proteína SpPol4 purificada. En segundo lugar, se realizó un estudio *in vivo* mediante el análisis genético de la delección sencilla del gen *pol4⁺* y en combinación con otros genes implicados en el BER de *S. pombe*.

1. RECONSTITUCIÓN *IN VITRO* DE LA REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASE

La eliminación del residuo dRP es un paso esencial para la progresión del mecanismo de BER. El sustrato utilizado en los ensayos de reconstitución *in vitro* de la reparación por BER, consiste en un ADN de cadena doble que presenta una base nitrogenada uracilo frente a una guanina, simulando la situación fisiológica en la que la citosina se desamina dando lugar a un uracilo. El ensayo, esquematizado en la **figura 22.A**, consiste en la incubación del sustrato de ADN con la enzima uracilo ADN glicosilasa (UDG), encargada de eliminar el uracilo, generando un sitio abásico que posteriormente va a ser sustrato de la AP endonucleasa (APE), la cual realiza un corte en posición 5' del sitio abásico. Se genera un sustrato sobre el que una ADN polimerasa pueda incorporar un nucleótido, señalando el inicio del papel de la polimerasa en esta ruta de reparación. A continuación, la actividad dRP liasa de la ADN polimerasa elimina el residuo 3' dRP y una ADN ligasa sella la unión. Pol β y Pol λ son capaces de promover eficientemente una reacción de BER *in vitro* en presencia de UDG (uracilo ADN glicosilasa), hAPE (AP-endonucleasa) y ADN ligasa I (Nicholl *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1998; García-Díaz *et al.*, 2001).

Dada la similitud existente entre Pol β y Pol λ respecto a SpPol4, se realizó un ensayo de reconstitución *in vitro* del mecanismo BER para evaluar si SpPol4 era capaz de sustituir la acción de Pol β y Pol λ . De este modo, en una reacción de reparación *in vitro* realizada como se describe en Materiales y Métodos, empleando Pol β y Pol λ , se pueden observar dos productos mayoritarios: un producto de 16 nucleótidos producido por la inserción de un único nucleótido ([α - 32 P]dCTP) en el extremo 3' hidroxilo del corte en 5' del sitio abásico y un producto de 34 nucleótidos que se corresponde con la reparación completa de la cadena de ADN por acción de la ADN ligasa. Tal y como indica la **figura 22.B**, Pol β , Pol λ y SpPol4 producen los mismos productos. Por lo tanto, SpPol4 es capaz de coordinar los pasos de reparación, relleno del hueco y eliminación del residuo dRP antes de la acción de la ligasa. Estos datos bioquímicos serían consistentes con una posible participación de SpPol4 en BER *in vivo*.

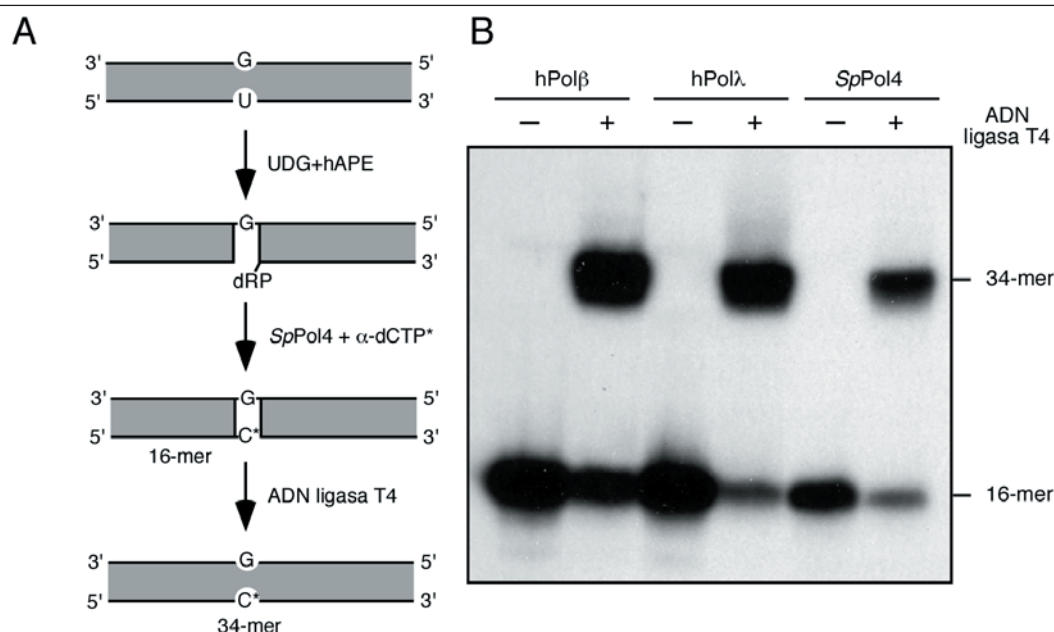


Figura 22. Reconstitución *in vitro* de la reacción de BER de tramo corto con *SpPol4*. (A) Representación esquemática de la reacción. Se trata un oligonucleótido de cadena doble que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena con una ADN glicosilasa específica (UDG) que se encarga de eliminar la base dañada (uracilo). A continuación, una AP endonucleasa (hAPE) escinde el enlace fosfodiéster en 5' del sitio abásico, generando un residuo desoxirribosa fosfato (dRP). Posteriormente, una ADN polimerasa con actividad dRP liasa elimina el residuo dRP e inserta el nucleótido complementario a la base molde del hueco generado (dCTP frente a dG). Por último, una ADN ligasa restablece la unión entre ambos segmentos de ADN. (B) Al añadir en el sustrato tratado un nucleótido marcado ([α - 32 P]dCTP) y Pol β (50 nM), Pol λ humana (50 nM) o *SpPol4* (50 nM), se obtienen dos productos marcados que pueden detectarse después de una electroforesis desnaturalizante (20% poliácridamida-8 M urea) y posterior autorradiografía: i) un producto de 16 mer originado por la adición de un único nucleótido en el 3' hidroxilo del sitio AP cortado en 5'; ii) un producto de 34 mer que corresponde a la reparación completa de la cadena de ADN después de la acción de la ligasa.

2. ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTANTES DE *Schizosaccharomyces pombe* EN LA RUTA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASE EN EL ADN

Basándonos en el modelo de reparación por BER del daño en el ADN inducido por el agente alquilante metil metanosulfonato (MMS) en *S. pombe* (Alseth *et al.*, 2005), se realizó un análisis genético de la delección sencilla del gen *pol4*⁺ y en combinación con genes pertenecientes a la ruta de reparación BER. La sensibilidad de los mutantes a MMS se evaluó sometiendo a las células a un daño crónico (ensayo de gota) o a un daño agudo (ensayo de viabilidad), utilizando distintas dosis del agente alquilante MMS.

Siguiendo el esquema de la **figura 23**, en *S. pombe* la ruta de BER en respuesta al daño inducido por MMS es iniciada por la acción de una ADN glicosilasa monofuncional, Mag1 (3-metiladenina ADN glicosilasa), la cual es esencial para la eliminación de los productos citotóxicos alquilados en el ADN generando sitios abásicos. De este modo, Mag1 inicia las dos rutas de BER en respuesta a MMS: BER de trecho corto (Nth1 dependiente) y BER de trecho largo (Rad2 dependiente) (Alseth *et al.*, 2005). En los sitios abásicos, el enzima bifuncional Nth1 (ADN glicosilasa/AP liasa), gracias a su actividad AP liasa, realiza un corte en posición 3' del sitio abásico dejando un residuo 3'dRP. La actividad AP liasa de Nth1 es crítica para la reparación de sitios abásicos inducidos por MMS, siendo un paso limitante para la iniciación de BER en *S. pombe* (Alseth *et al.*, 2004). El residuo 3'dRP es eliminado por la actividad fosfodiesterasa de una AP endonucleasa bifuncional, Apn2. A continuación, una ADN polimerasa se

encargaría de rellenar el hueco y una ADN ligasa sellaría la unión. En *S. pombe*, el camino principal de reparación de sitios abásicos se realiza por la ruta de reparación BER de trecho corto descrita anteriormente, en la que se sustituye un único nucleótido. El camino alternativo para la reparación de sitios abásicos dependiente de AP endonucleasas en *S. pombe*, BER de trecho largo, es menos importante. La ruta BER de trecho largo se inicia por el corte de Apn2 en posición 5' del sitio abásico generando un residuo 5'dRP. A continuación, Rad2 (homólogo de FEN-1 en mamíferos y Rad27 en *S. cerevisiae*) realiza un desplazamiento y posterior eliminación de 2 a 8 nucleótidos en la cadena que contiene el residuo 5'dRP (Alleva & Doetsch 1998; Memisoglu & Samson, 2000b). Seguidamente actuaría un ADN polimerasa para rellenar el hueco y una ADN ligasa sellaría la unión. Teniendo en cuenta los datos publicados hasta el momento, en *S. pombe* el mecanismo de reparación por BER en cualquiera de sus versiones, no requiere de la participación de una actividad dRP liasa, a diferencia de lo que sucede en mamíferos. De acuerdo a las características enzimáticas de SpPol4 descritas en el capítulo anterior, SpPol4 podría actuar como la polimerasa encargada de rellenar el hueco generado tanto por la acción de Nth1 y Apn2 en el BER de trecho corto, como por la acción de Apn2 y Rad2 en el BER de trecho largo, debido a su preferencia por sustratos de ADN con pequeños huecos. Además, gracias a su actividad dRP liasa intrínseca podría actuar detrás de Apn2, eliminando el residuo 5'dRP, con un papel similar al de Polβ en mamíferos.

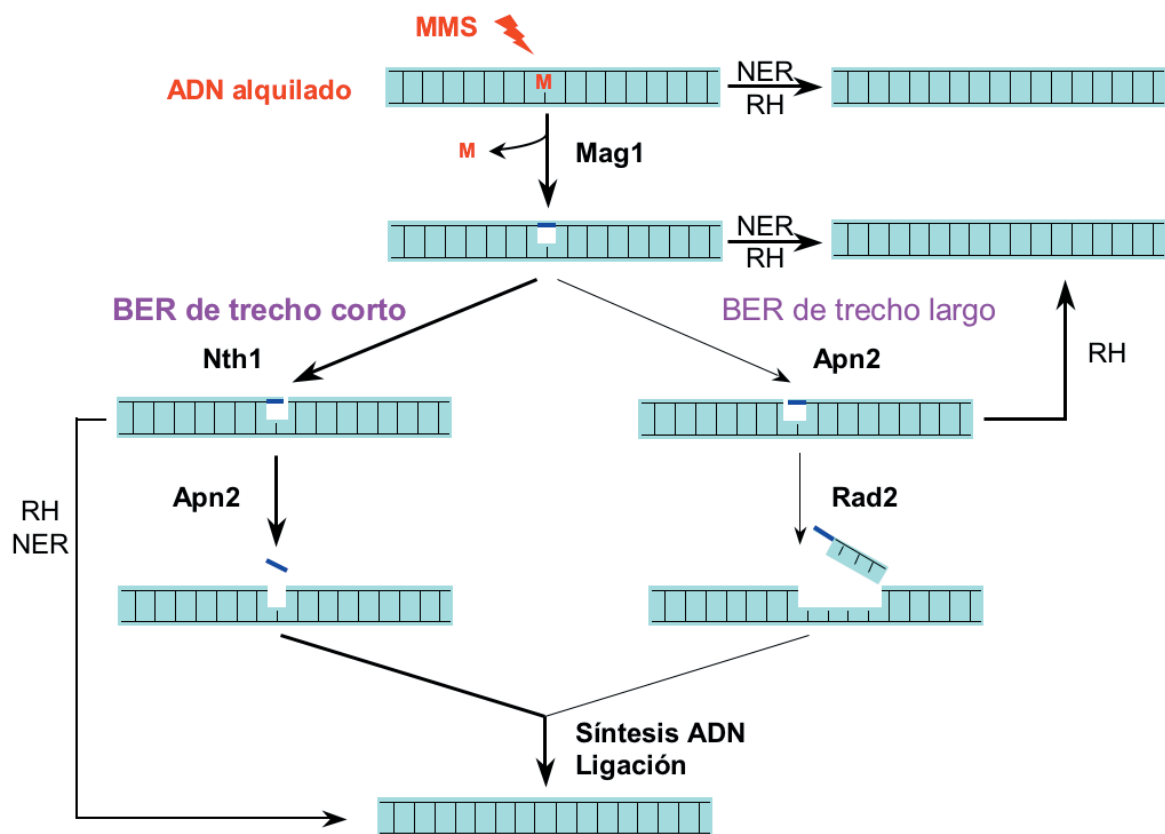


Figura 23. Modelo de reparación del daño en el ADN inducido por MMS en *S. pombe*. Las abreviaturas incluidas en la figura hacen referencia a los siguientes términos: MMS, metil metanosulfonato; M, base metilada; BER, reparación por escisión de base; NER, reparación por escisión de nucleótido; RH, recombinação homóloga. Figura adaptada de Alseth *et al.* (2005).

Nuestros resultados muestran que el gen *pol4*⁺ no es esencial en *S. pombe*. En condiciones normales, el mutante *pol4Δ* no muestra un fenotipo obvio en relación a su crecimiento y viabilidad celular (datos no mostrados), al igual que su ortólogo en *S. cerevisiae* (Prasad *et al.*, 1993; Leem *et al.*, 1994; Budd & Campbell, 1995). En *S. cerevisiae*, el papel de ScPol4 en la reparación BER no está del todo claro, ya que tanto el mutante haploide *pol4*, como el mutante diploide *pol4/pol4*, presenta una modesta sensibilidad a MMS (Sterling & Sweasy, 2006). De forma análoga, cuando se analiza la sensibilidad del mutante *pol4Δ* de *S. pombe* a altas dosis de MMS, solo se observa una pequeña reducción de la viabilidad, no siendo más sensible que la cepa silvestre (**Figura 24**). Por lo tanto, por si sola SpPol4 parece ser dispensable en la reparación inducida por MMS.

Como se describe en Alseth *et al.* (2004), nuestros resultados del análisis genético de mutantes de delección en la ruta de reparación por BER en respuesta a MMS (**Figura 24.A y B**) confirman que Apn2 tiene una función importante en el mecanismo de BER, pues el mutante *apn2Δ* es hipersensible a MMS. Esta hipersensibilidad es debida a que la ausencia de Apn2 impide el procesamiento del residuo 3' dRP, intermediario tóxico que no puede ser extendido por una ADN polimerasa ni ligado por una ADN ligasa. Esta hipersensibilidad se ve aliviada por la delección adicional del gen *nth1*⁺ (doble mutante *nth1Δ apn2Δ*), indicando que Apn2 y Nth1 participan en la misma vía de reparación, Nth1 actúa en primer lugar por encima de Apn2. Bajo estas condiciones, delecionamos adicionalmente el gen *pol4*⁺, el triple mutante *nth1Δ apn2Δ pol4Δ* muestra la misma sensibilidad que el doble mutante *nth1Δ apn2Δ* (**Figura 24.A**). Sin embargo, de forma análoga al mutante *nth1Δ*, el mutante *pol4Δ* suprime aunque parcialmente, la hipersensibilidad del mutante *apn2Δ* (doble mutante *apn2Δ pol4Δ*) (**Figura 24.B**). La naturaleza de esta supresión se podría explicar si SpPol4 fuera una alternativa para empezar el BER de trecho corto en ausencia de Nth1, si presentara actividad AP liasa como su ortólogo Polβ en mamíferos (Prasad *et al.*, 1998a). Sin embargo, como se demuestra en el capítulo anterior, al igual que Polμ y Polλ, SpPol4 carece de actividad AP liasa (**Figura 21**). Diferentes estudios han demostrado que el mecanismo de BER junto con el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (NER) y la recombinación homóloga (RH) participan en la reparación del daño inducido por MMS (Memisoglu & Samson 2000b; Osman *et al.*, 2003). Los resultados muestran que la presencia de SpPol4 podría interferir, en ausencia de Apn2, en el procesamiento del producto tóxico generado por Nth1 (3' dRP). De este modo, la ausencia de SpPol4 favorecería que el daño fuese reparado por recombinación homóloga o NER. Por otro lado, al deleccionar el gen *pol4*⁺ en combinación con la delección de los genes *mag1*⁺ (doble mutante *mag1Δ pol4Δ*) o *nth1*⁺ (bloqueando BER de trecho corto, doble mutante *nth1Δ pol4Δ*) no se observa ningún efecto (**Figura 24.A**).

Como se ha descrito anteriormente por Memisoglu & Samson (2000a), el mutante *rad2Δ* es sensible a MMS debido al bloqueo del BER de trecho largo. Al deleccionar el gen *rad2*⁺ (bloqueando BER de trecho largo) junto con el gen *pol4*⁺ (doble mutante *rad2Δ pol4Δ*) no se observa una diferencia significativa respecto a los mutantes simples correspondientes (**Figura 24.C**). Sin embargo, cuando ambas rutas del BER se bloquean simultáneamente (doble mutante *nth1Δ rad2Δ*), la sensibilidad a MMS aumenta significativamente, incrementándose con la delección adicional del gen *pol4*⁺ (triple mutante *nth1Δ rad2Δ pol4Δ*) (**Figura 24.C**). Es posible que, en ausencia de Nth1 y Rad2, pueda tener lugar un camino alternativo, en el que SpPol4 actúe detrás de la acción de Apn2. Este camino sería equivalente al mecanismo de reparación BER de trecho corto utilizado en mamíferos, el cual es iniciado por la acción de Apn2 que

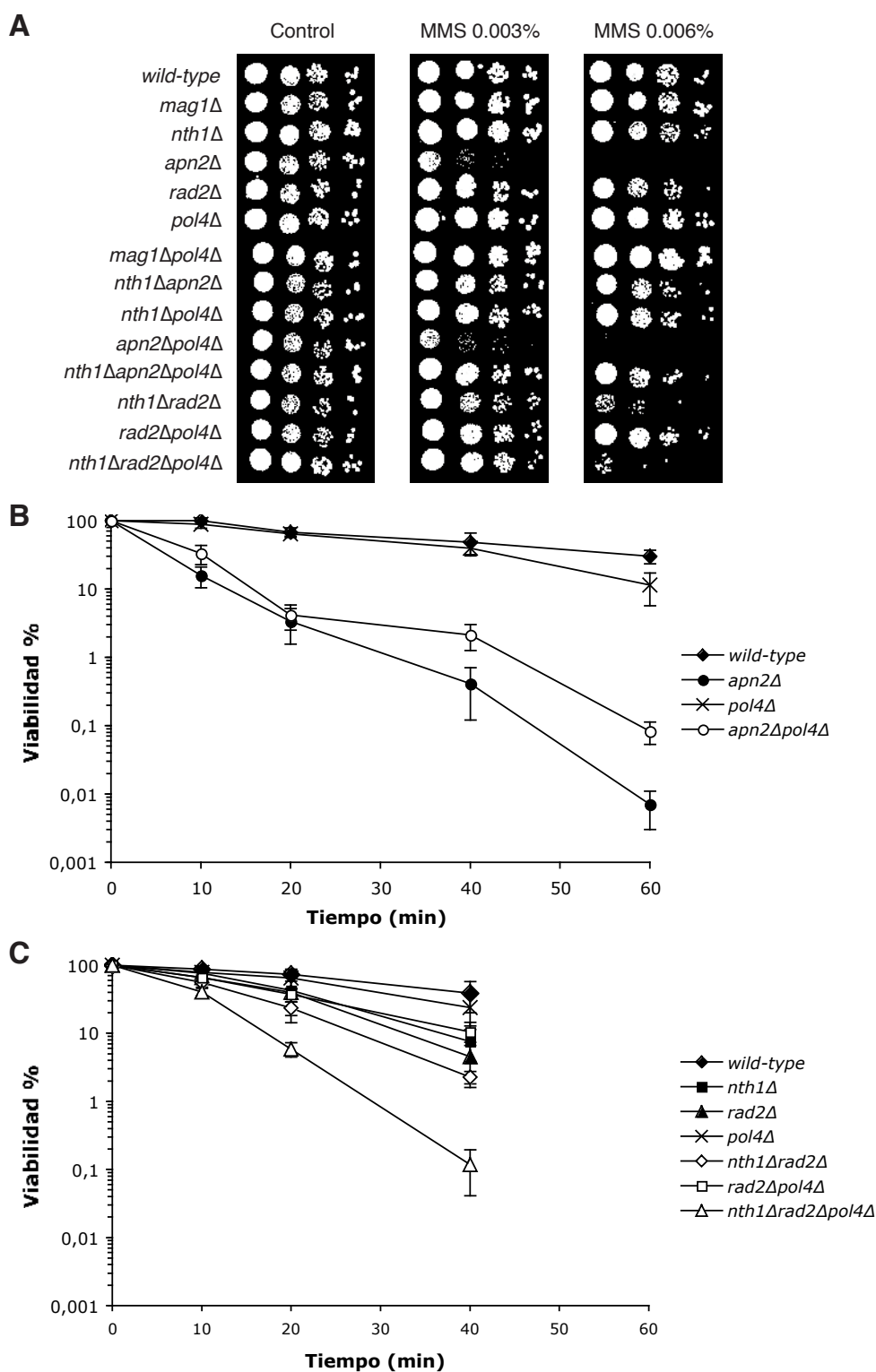


Figura 24. Análisis genético de mutantes BER en respuesta a MMS en *S. pombe*. (A) Las cepas *wild-type*, *mag1Δ*, *nth1Δ*, *apn2Δ*, *rad2Δ*, *pol4Δ*, *mag1Δpol4Δ*, *nth1Δapn2Δ*, *nth1Δpol4Δ*, *apn2Δpol4Δ*, *nth1Δapn2Δpol4Δ*, *nth1Δrad2Δ*, *rad2Δpol4Δ* y *nth1Δrad2Δpol4Δ* se cultivan hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} , y estas diluciones se plaquean por goteo (4μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con las dosis de MMS indicadas. (B) Las cepas *wild-type* (rombos), *apn2Δ* (círculos), *pol4Δ* (cruces) y *apn2Δpol4Δ* (círculos blancos) se cultivan hasta fase logarítmica, se les añade 0.02% de MMS, se recogen muestras cada 10, 20, 40 y 60 minutos, y se diluyen los cultivos sembrándolos en placas de medio rico YES. (C) Las cepas *wild-type* (rombos), *nth1Δ* (cuadrados), *rad2Δ* (triángulos), *pol4Δ* (cruces), *nth1Δrad2Δ* (rombos blancos), *rad2Δpol4Δ* (cuadrados blancos) y *nth1Δrad2Δpol4Δ* (triángulos blancos) se cultivan hasta fase logarítmica, se les añade 0.02% de MMS, se recogen muestras cada 10, 20 y 40 minutos, y se diluyen los cultivos sembrándose en placas de medio rico YES. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

realiza el corte en posición 5' del sitio abásico generando un residuo 5'dRP (Dianov *et al.*, 2003; Slupphaug *et al.*, 2003) y en el que la actividad dRP liasa de Pol β es crucial para eliminar el daño seguido del paso de síntesis de ADN. En conclusión, *SpPol4*, basándose en su actividad dRP liasa, podría tener un papel auxiliar en la reparación del daño por MMS en *S. pombe*.

3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD dRP LIASA DE *SpPol4* EN *S. pombe*

Para evaluar la importancia *in vivo* de la actividad dRP liasa de *SpPol4* en *S. pombe* se analizó la capacidad de eliminación del residuo 5'dRP de extractos celulares totales *wild-type* y carentes de *SpPol4*. Para ello, se empleó un sustrato de ADN de doble cadena de 34 pares de bases, el cual contenía un uracilo en la posición 16. Como se describe en Materiales y Métodos, la cadena que contiene el uracilo se marca en 3' con [α - 32 P]dCTP para posteriormente hibridarse con su cadena complementaria. Se trató el sustrato de ADN de doble cadena con uracilo ADN glicosilasa (UDG) para eliminar el uracilo, dejando un sitio abásico que es sustrato de la AP endonucleasa humana (hAPE1), generando un sustrato que presenta un residuo dRP (ver esquema figura 25.A). Este sustrato se incubó con concentraciones crecientes de extractos celulares totales *wild-type* y carentes de *SpPol4*. Los extractos se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos y se cuantificaron mediante un ensayo de Bradford. Como se puede observar en la figura 25.B la ausencia de *SpPol4* implica una reducción de la actividad dRP liasa total del extracto; *SpPol4* aportaría aproximadamente el 40% de la actividad dRP liasa del extracto.

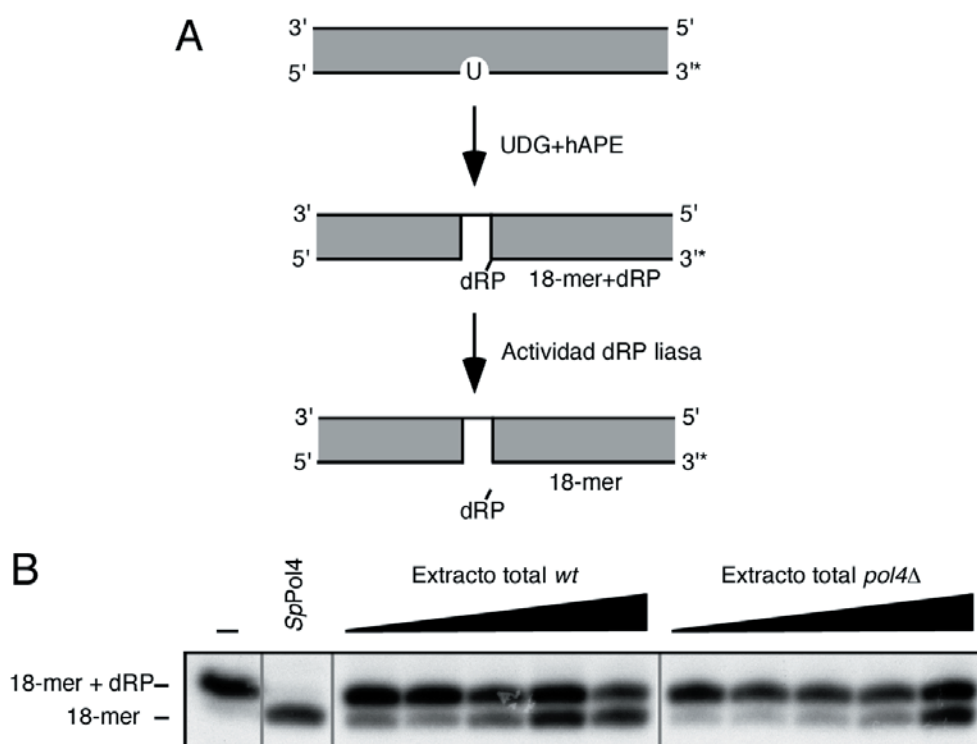


Figura 25. Ensayo actividad dRP liasa en extractos celulares totales de *S. pombe*. (A) El esquema muestra un ADN de cadena doble que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena, todo ello marcado en el extremo 3' (*). Después del tratamiento con UDG y hAPE, se obtiene un sustrato con un corte que contiene un residuo dRP (18 mer+dRP) el cual se escinde mediante una actividad dRP liasa (18 mer). (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se indica en Materiales y Métodos, empleando 500 mM de *SpPol4* y concentraciones crecientes de extracto celulares totales de las cepas *wild-type* y *pol4Δ* en fase logarítmica (0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg), detectándose un producto de 18 mer después de una electroforesis desnaturante en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

Este dato resalta la importancia de la actividad dRP liasa *in vivo* de SpPol4 asociada o no a la ruta de reparación BER. Los niveles residuales observados de actividad dRP liasa en ausencia de SpPol4 pueden ser debidos a la existencia de otras enzimas con la misma actividad. De acuerdo con esto, se ha descrito la actividad dRP liasa en dos nuevas ADN polimerasas humanas Pol ι (Bebenek *et al.*, 2001) y Pol γ (Longley *et al.*, 1998; Pinz & Bogenhagen, 2000), además de en la ADN polimerasa Trf4 de *S. cerevisiae* (Gellon, *et al.*, 2008).

4. ANÁLISIS DE LA MUTAGÉNESIS ESPONTÁNEA E INDUCIDA POR MMS

Para evaluar la importancia del gen *pol4⁺* en el mantenimiento de la integridad del genoma, se midió la frecuencia de mutación espontánea e inducida por MMS del mutante *pol4 Δ* utilizando un ensayo de resistencia a canavanina. La canavanina es un aminoácido no proteico análogo tóxico de la arginina, que difiere de ésta en el extremo C-terminal, y por lo tanto, impide la formación del enlace peptídico, inhibiendo así la síntesis de proteínas al incorporarse en lugar de la arginina. Tanto la arginina como la canavanina se introducen en la célula por medio de la misma permeasa. La canavanina introducida en la célula se incorpora en la ruta de síntesis de proteínas induciendo muerte celular. Mutaciones en dicha permeasa impiden la entrada en la célula de canavanina, generando células resistentes (Can^r) y manteniéndose por tanto, una correcta síntesis de proteínas y viabilidad celular. En *S. cerevisiae*, el gen *CAN1* codifica dicha arginina permeasa (Hoffmann, 1985). Sin embargo, en *S. pombe* no se ha encontrado hasta el momento el gen homólogo *can1⁺*, pero se ha demostrado que el gen *CAN1* de *S. cerevisiae* complementa células resistentes a canavanina en *S. pombe*, sugiriendo que también *S. pombe* codifica una arginina permeasa y estableciéndose un mecanismo de actuación similar en ambas levaduras (Fantes & Creanor, 1984; Ekwall & Ruusala, 1991).

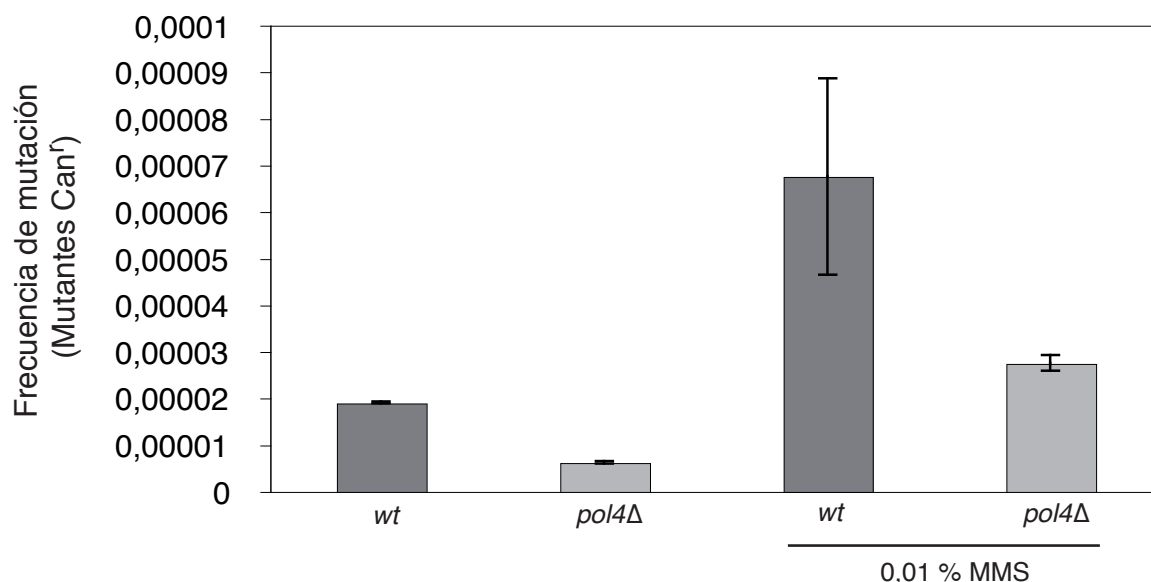


Figura 26. Análisis de la mutagénesis espontánea e inducida por MMS en el mutante *pol4 Δ* . La figura muestra la frecuencia de mutación de las cepas *wild-type* y *pol4 Δ* espontánea e inducida por 0.01% de MMS, calculada como la proporción entre el número de células resistentes a canavanina (Can^r) y el número de células totales. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

Como muestra la **figura 26**, la frecuencia de mutación espontánea de la cepa silvestre es 3 veces más alta que el mutante *pol4Δ*, es decir, que la presencia del gen *pol4⁺* induce mutaciones. Este resultado nos indica que *SpPol4* participa de forma directa en la capacidad de mutagénesis adaptativa de *S. pombe* y su ausencia contribuye a una mayor estabilidad genómica. Como se muestra en el capítulo anterior, la síntesis de ADN llevada a cabo por *SpPol4* es dirigida por molde siguiendo fielmente las reglas de apareamiento de Watson y Crick. Por lo tanto, la disminución de la frecuencia de mutación en el mutante *pol4Δ* puede explicarse si *SpPol4* contribuyera a la síntesis a través de lesiones, copiando, aunque de forma errónea, bases dañadas en el ADN. Alternativa o adicionalmente, *SpPol4* podría participar en mecanismos de reparación cuyo resultado sea mutagénico. El resultado fue similar cuando realizamos el mismo ensayo en presencia de MMS, siendo la frecuencia de mutación de la cepa silvestre 2,5 veces más alta que la del mutante *pol4Δ*, lo que nos indica que participaría en una reparación mutagénica del daño inducido por MMS.

5. PARTICIPACIÓN DE *SpPOL4* EN LA RUTA DE BER DE TRECHO LARGO

Se ha descrito que Pol β tiene también un papel significativo en el mecanismo de reparación por BER de trecho largo (Dianov *et al.*, 1999; Horton *et al.*, 2000; Podlutsky *et al.*, 2001a; Prasad *et al.*, 2001), en el que está encargada de iniciar la síntesis de ADN y el desplazamiento de banda añadiendo un único nucleótido como paso previo al acceso de las ADN polimerasa replicativas, Pol δ y Pol ϵ , que continuarían la polimerización. El desplazamiento de banda por Pol β se ve estimulado por FEN-1, enzima esencial para el BER de trecho largo (Prasad *et al.*, 2000). Dependiendo de la lesión en el ADN, se generan desoxirribosas que pueden ser resistentes a la β -eliminación, tales como sitios abásicos reducidos, que son eliminados por el BER de trecho largo (Podlutsky *et al.*, 2001a).

En *S. cerevisiae* se ha demostrado una interacción física y funcional de ScPol4 con Rad27, homólogo de FEN-1 en mamíferos y de Rad2 en *S. pombe* (Tseng & Tomkinson, 2004), pero en un contexto diferente a la reparación por BER: concretamente en el procesamiento y la unión de dos extremos 5' incompatibles en mecanismos de reparación de roturas de doble cadena de ADN. Esto no descarta la participación de ScPol4 en el BER de trecho largo de este organismo.

Como primer paso para evaluar el papel de *SpPol4* en BER de trecho largo, analizamos *in vitro* la capacidad de desplazar banda e incorporar dNTPs en diferentes sustratos de ADN que reproducen las condiciones *in vivo* de esta ruta de reparación. Para ello se han utilizado los sustratos de ADN esquematizados en la **figura 27.A**. Como se observa en la **figura 27.B**, en las tres estructuras que presentan una región de cadena sencilla formando algún tipo de *flap* frente al punto de polimerización (D-loop, F15 y F10), *SpPol4* muestra una mayor eficacia de polimerización así como evidencia su capacidad para realizar cierto grado de desplazamiento de banda de ADN en posición 3', incorporando hasta 3 nucleótidos. De este modo, *SpPol4* podría participar en la ruta de BER de trecho largo gracias a su capacidad de insertar nucleótidos *in vitro* de forma acoplada a un desplazamiento de banda.

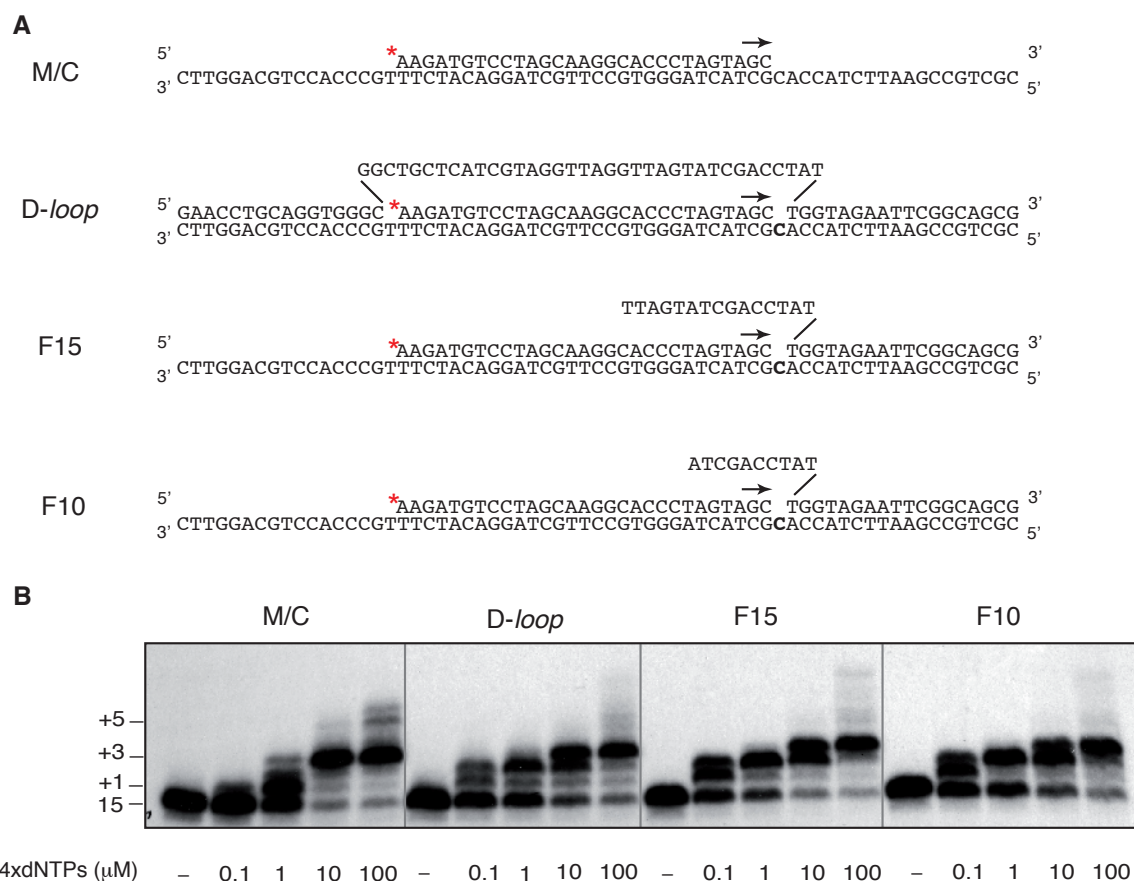


Figura 27. Participación de *SpPol4* en el BER de trecho largo. (A) Esquema de los cuatro tipos de moléculas utilizadas: M/C (molde/cebador), D-loop, F15 y F10. La flecha indica el sentido de la polimerización. **(B)** Síntesis de ADN de *SpPol4* en las estructuras de ADN descritas arriba. Las reacciones se realizaron como se describe en Materiales y Métodos utilizando 100 nM de *SpPol4* y las concentraciones indicadas de dNTPs. La extensión del cebador se analizó en geles de 20% poliácridamida-8 M urea y posterior autorradiografía. La movilidad del cebador no extendido (15) y de la extensión de 1 desoxinucleótido (+1), 3 desoxinucleótidos (+3) y 5 desoxinucleótidos (+5) se indica en la autorradiografía.

III. Reparación de roturas de doble cadena en el ADN

1. CAPACIDAD DE UNIÓN AL ADN DE *SpPol4* EN AUSENCIA DE CEBADOR Y SU IMPORTANCIA EN LA RUTA DE REPARACIÓN NHEJ

El mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) requiere la asociación de los extremos de dos moléculas de ADN, ya sean romos o con una corta protuberancia de una de las cadenas. Los extremos protuberantes pueden ser de dos tipos: 3' ó 5' protuberantes. Los extremos 5' protuberantes podrían ser rellenados en pasos previos a su unión, gracias a la presencia de un grupo hidroxilo en el extremo 3' y a una hebra molde para la síntesis, generando un extremo romo que puede ser ligado directamente. Sin embargo, cualquier evento de polimerización sobre los extremos 3' protuberantes (a excepción de una actividad transferasa terminal) requiere previamente su unión, para así disponer de una hebra molde. La capacidad de unión de una ADN polimerasa a este tipo de extremos de ADN podría ser una ventaja a la hora de llevar a cabo el relleno de los huecos generados durante el proceso de unión de extremos, ya que situaría a la enzima en una posición privilegiada para iniciar la polimerización. La unión a este tipo de moléculas puede producirse de dos formas diferentes, ya que la ADN polimerasa podría unirse al extremo 3' protuberante o al extremo 5' recesivo. Para dilucidar si *SpPol4* es capaz de unirse a este tipo de moléculas 3' protuberantes se realizaron ensayos de retraso en gel con moléculas formadas por el oligonucleótido molde y el oligonucleótido *downstream*, pero en ausencia de cebador, con lo que se genera una molécula con un extremo 3' protuberante (ver esquema en la **figura 28**). Del mismo modo, se analizó la unión a moléculas en las que el extremo 5' recesivo tuviese un grupo fosfato o un grupo hidroxilo, dada la preferencia de *SpPol4* por las moléculas con grupo fosfato en 5'.

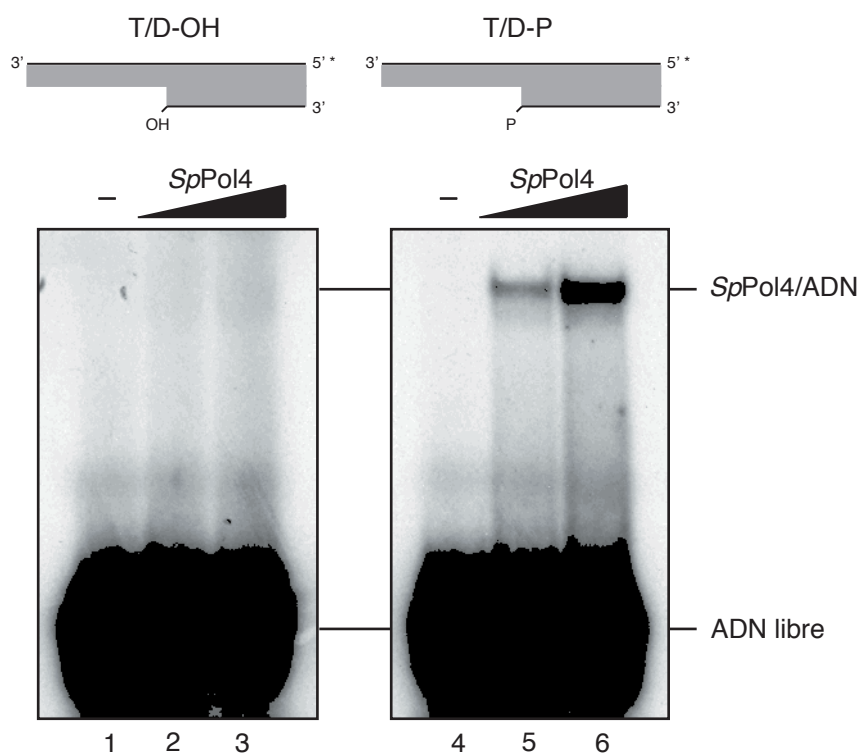


Figura 28. Capacidad de unión de *SpPol4* a moléculas de ADN en ausencia de cebador. Esquema de los dos tipos de moléculas utilizadas: molde/downstream con un grupo hidroxilo en el 5' (T/D-OH) y con un grupo fosfato en el 5' del hueco (T/D-P). Los moldes marcados (*) y los grupos hidroxilo (OH) y fosfato (P) en 5' están indicados. El ensayo de retraso en gel se realizó como se describe en Materiales y Métodos en ausencia de enzima (carriles 1 y 4) y utilizando 100 ng (carriles 2 y 5) y 200 ng (carriles 3 y 6) de *SpPol4*. La formación de los complejos *SpPol4*-ADN se analizó en geles de electroforesis nativos 4% poliacrilamida (80:1; monómero/bis). En la radiografía se indican las movilidades del ADN libre y de los complejos *SpPol4*/ADN.

Como se observa en la **figura 28**, *SpPol4* se une establemente a las moléculas 3' protuberantes en las que el extremo 5' recesivo posee un grupo fosfato, lo que indica que la unión se produce con el extremo 5' recesivo y no con el 3' protuberante. Esta unión "orienta" a la molécula de ADN polimerasa, cuyo centro activo de polimerización no puede utilizar el extremo 3' de la misma molécula (extremo) de ADN, quedando a la espera de un extremo 3' hidroxilo que se genere durante la unión de los extremos de la rotura. Esta capacidad de *SpPol4* podría ser beneficiosa en dos aspectos diferentes. En primer lugar, la presencia de *SpPol4* a la espera de un grupo 3' hidroxilo desde el que iniciar la catálisis podría hacer mejorar la eficiencia global de la ruta, ya que no tendría que ganar el acceso al sustrato, sino que formaría parte de él de forma previa a la reacción. En segundo lugar, *SpPol4* podría acceder al sustrato de ADN de forma previa a las nucleasas, lo que podría significar que *SpPol4* pudiera mediar en un primer intento de relleno de huecos y ligación independiente de actividad exonucleolítica, como forma de prevenir la pérdida de información genética. Si los niveles de complementariedad de secuencia fuesen insuficientes para la unión y sellado de los extremos, entrarían en juego las nucleasas, con el fin de aumentar el grado de complementariedad entre extremos para poder reparar la rotura de doble cadena (DSB).

2. CAPACIDAD DE *SpPOL4* DE ACEPTAR Y/O CREAR DISTORSIONES EN EL ADN

La Polμ humana posee una fidelidad de síntesis muy baja, cometiendo errores de manera muy frecuente gracias a su capacidad de inducir y aceptar dislocaciones en la cadena molde, y permitiendo que la entrada de nucleótido venga dirigida por posiciones adyacentes alejadas del extremo del cebador (Zhang *et al.*, 2001; Ruiz *et al.*, 2004). Esta característica es crucial para la función de Polμ en NHEJ. Para evaluar el comportamiento de *SpPol4* se analizó la síntesis de ADN con un molde cuya secuencia presentaba un contexto apropiado para poder evaluar si su mecanismo de acción se ajustaba a los siguientes modelos previamente descritos para otras ADN polimerasas (Bebenek & Kunkel, 2000); modelo de dislocación mediada por deslizamiento o por la selección del dNTP y la recolocación del cebador frente a la extensión del desapareamiento.

2.1. Modelo de dislocación

Este modelo de dislocación propone el establecimiento de un apareamiento erróneo transitorio, propiciado en el caso que las bases $n-1$ y n fueran iguales, ya que el deslizamiento del molde quedaría estabilizado por el mantenimiento del extremo del cebador apareado. Este mecanismo de dislocación fue inicialmente descrito para Polβ, el cual explicaría las mutaciones por delección de nucleótidos y sustitución de bases que produce esta polimerasa en determinados puntos de la secuencia de ADN (Kunkel, 1985).

Como se muestra en el esquema de la **figura 29.A**, la cadena molde utilizada presenta una repetición de dA, por lo que la síntesis normal de ADN se dirigiría a una incorporación de dT; sin embargo, si hay un deslizamiento, la primera base que dirigiría la inserción no sería una dA sino dC, por lo que se incorporaría dG. El experimento de la **figura 29.A** muestra una comparación de la capacidad de dislocación de *SpPol4* frente a la de Polμ y Polλ, para lo cual se suministró cada nucleótido individualmente y así identificar el mecanismo óptimo para cada ADN polimerasa. A diferencia de Polμ, que

claramente prefiere incorporar dG debido a un mecanismo de dislocación mediada por deslizamiento, Pol λ y SpPol4 incorporan preferentemente dT. Sin embargo, ambas polimerasas también incorporan dG y por lo tanto, tienen la capacidad de sintetizar ADN mediante un mecanismo de dislocación por deslizamiento de la cadena molde.

Sin embargo, no es estrictamente necesario que las bases $n-1$ y n del molde sean idénticas para que ocurra un mecanismo similar. En un complejo ternario, un intermedio mal alineado de un nucleótido molde no repetitivo podría estabilizarse por interacciones de apilamiento con los dNTPs o con aminoácidos en la polimerasa (Kunkel, 1986). A este mecanismo se le denomina dislocación estabilizada por el dNTP entrante. La complementariedad entre el nucleótido entrante y la base molde $n+1$ contribuiría a la estabilización de la interacción del nucleótido molde n no repetitivo con los aminoácidos de la polimerasa o con los nucleótidos presentes en el sitio activo. Tal y como indica el esquema de la **figura 29.B**, el cambio de la tercera dA por una dG (nucleótido n del molde) reduce las posibilidades de un deslizamiento del molde, por lo tanto, la síntesis de ADN está restringida a la incorporación de la base correcta dC. Como se dijo anteriormente para Pol μ , la dislocación del molde se produce por estabilización del dNTP entrante que, en cierto modo, selecciona el nucleótido “director” (Ruiz *et al.*, 2004). Como muestra la **figura 29.B**, sólo Pol μ es capaz de incorporar la base complementaria a la posición $n+2$ (dG) del molde (dC). Tanto Pol λ como SpPol4 realizaron una síntesis dirigida por la base n del molde (dG), incorporando la base complementaria (dC).

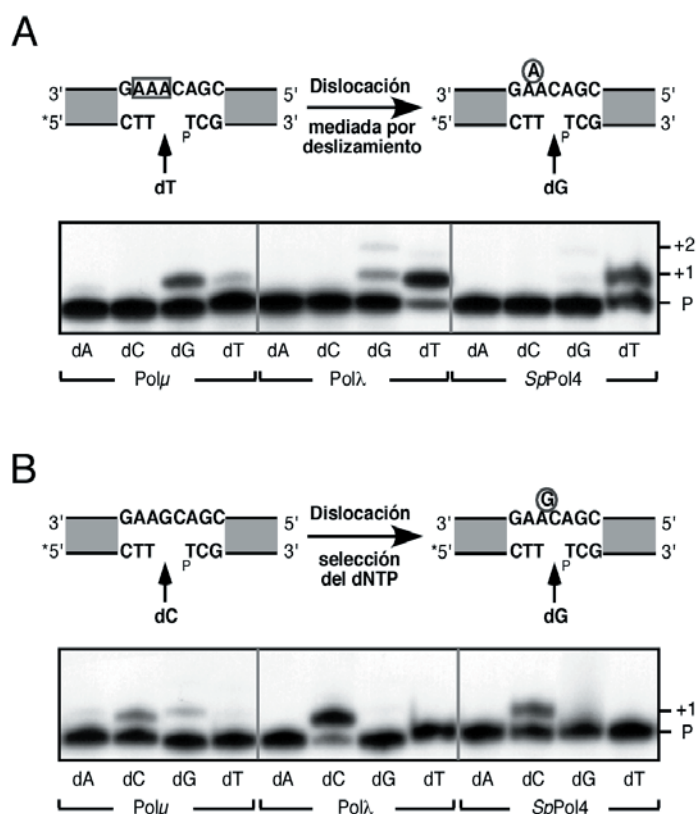


Figura 29. Caracterización de la capacidad de dislocación del molde de SpPol4. Los esquemas representan los contextos de secuencia del molde apropiados para evaluar la dislocación mediada por deslizamiento (**A**) y la dislocación mediada por selección de dNTP (**B**). Se indican el cebador marcado (*) y el grupo fosfato en 5' (P). Los nucleótidos desapareados transitoriamente se indican con un círculo. Los apareamientos correctos con el cebador se indican con una caja. El ensayo de polimerización se realiza como se describe en Materiales y Métodos en presencia de diferente concentración para cada ADN polimerasa: Pol μ (500 nM), Pol λ (100 nM) y SpPol4 (5 μ M). Se analiza la extensión del cebador en geles 20% poliácridamida-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la movilidad del cebador sin extender (P) y la extensión de 1 nucleótido (+1) y 2 nucleótidos (+2).

2.2. Recolocación del cebador

Para determinar la capacidad de *SpPol4* de extensión de un desapareamiento, se utilizó la molécula esquematizada en la **figura 30** en la cual la base molde $n+1$ fuera complementaria a una base erróneamente incorporada en el cebador. Ni *SpPol4* ni otras PolXs pueden eliminar los nucleótidos desapareados en el 3' del cebador, por lo que sólo existen dos posibilidades: i) extensión directa del desapareamiento insertando dC; ii) recolocación del cebador insertando dG. En el último caso la distorsión requerida sería similar a la que se necesita para reproducir la inserción errónea de un nucleótido mediante un mecanismo de dislocación del molde descrito anteriormente, generando así una molécula molde/cebador que contiene un nucleótido desapareado precediendo a un par de bases correctamente apareadas, involucrando al extremo 3' del cebador y facilitando así la posterior extensión. Como se muestra en la **figura 30**, Pol μ es capaz de extender el desapareamiento con cualquiera de los cuatro dNTPs, de acuerdo con su propensión a cometer errores. Pol λ utiliza ambas alternativas igual de bien. En cambio *SpPol4* se comporta de una manera más restrictiva, sólo siendo capaz de insertar dG, lo que nos indica que tiene la capacidad de recolocar el cebador.

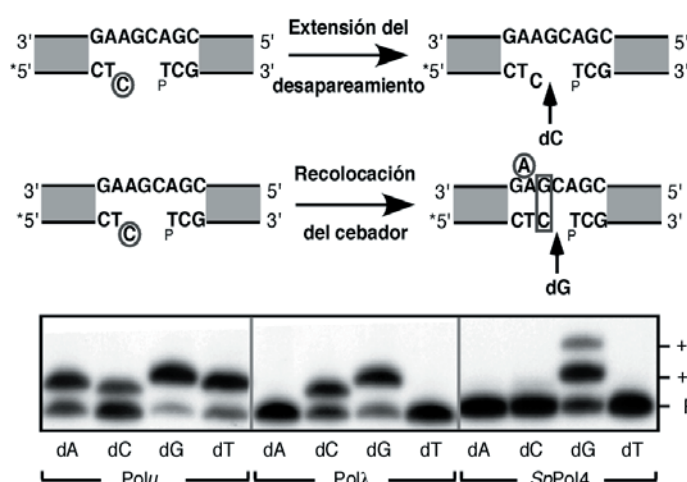


Figura 30. Caracterización de las capacidad de recolocación del cebador por *SpPol4*. El esquema representa el contexto de secuencia del molde apropiado para evaluar la recolocación del cebador frente a la extensión directa del desapareamiento. Se indica el cebador marcado (*) y el grupo fosfato en 5' (P). Los nucleótidos desapareados transitoriamente se indican con un círculo. Los apareamientos correctos con el cebador se indican con una caja. El ensayo de polimerización se realiza como se describe en Materiales y Métodos utilizando 250 nM tanto de *SpPol4* como de Pol λ y Pol μ humanas, en presencia de cada uno de los dNTPs por separado a 10 μ M en todos los casos. Se analiza la extensión del cebador en geles 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la movilidad del cebador sin extender (P) y la extensión de 1 nucleótido (+1) y 2 nucleótidos (+2).

En conjunto los resultados anteriores muestran que la capacidad de *SpPol4* para dislocar el molde y recolocar el cebador le capacita para un posible papel en NHEJ *in vivo*.

3. ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTANTES DE *Schizosaccharomyces pombe* EN LA REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA EN EL ADN

Como se ha comentado anteriormente, en levaduras el mecanismo mayoritario para la reparación de DSB es la recombinación homóloga (HR), mientras que el mecanismo de reparación por NHEJ quedaría restringido a la fase G1 del ciclo celular (Aylon *et al.*, 2004; Ferreira & Cooper, 2004; Ira *et al.*, 2004; Sonoda *et al.*, 2006). Para abordar el estudio de la participación de *SpPol4* en los mecanismos de reparación de DSB se realizó un análisis genético de la delección sencilla del gen *pol4*⁺ y en combinación con otros genes implicados en HR (*RAD51* homologue *S. pombe*, *rhp51*⁺) y NHEJ (*pku70*⁺) en *S. pombe*. La sensibilidad de los mutantes a distintos agentes causantes de DSB en el ADN se evaluó sometiendo a las células a un daño crónico (ensayo de gota). También se realizó

un análisis de la sensibilidad de los mutantes en células sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular, bien mediante la eliminación del N_2 del medio, o bien utilizando el mutante *wee1-50* el cual se caracteriza por presentar una fase G1 extendida (Nurse, 1975).

3.1. Efecto de distintos agentes inductores de daño en el ADN en el mutante *pol4Δ* en un fondo carente de HR

En *S. pombe*, se ha descrito que mutantes carentes de NHEJ presentan una sensibilidad muy pequeña o nula a distintos agentes genotóxicos que causan DSB en el ADN (Manolis *et al.*, 2001; Ferreira & Cooper, 2004). Este fenotipo se explica por la distribución del ciclo celular de *S. pombe* en células crecidas en condiciones óptimas (fase logarítmica). Como se observa en la **figura 31**, el ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por presentar una fase G1 muy corta y una extensa fase G2. Además, la citoquinesis sucede cuando las células casi han completado la fase S. La progresión del ciclo celular en *S. pombe* está coordinada con el tamaño celular. Esta coordinación tiene lugar en dos puntos de control: en G1 y en G2 en la iniciación de la mitosis. Por lo tanto, en un cultivo asincrónico la mayoría de las células, aproximadamente un 75%, se encuentran en la fase G2 del ciclo celular presentando un contenido 2C de ADN. De este modo, la reparación de DSB por HR se encuentra favorecida.

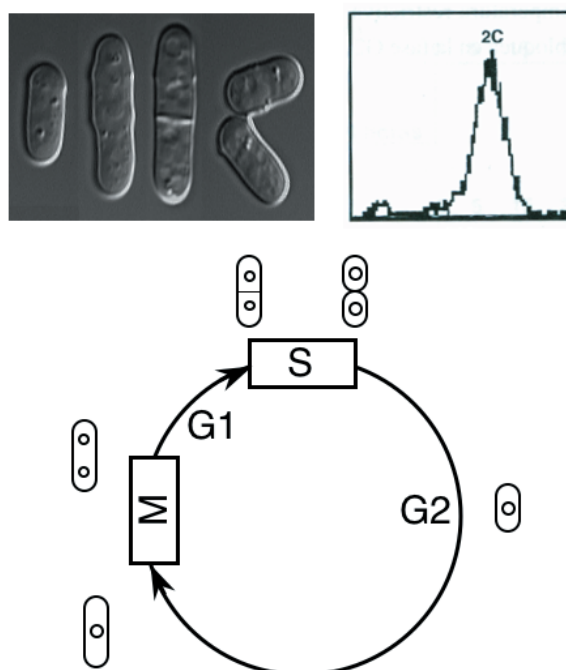


Figura 31. Ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*. El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por presentar una fase G1 especialmente corta y porque la citoquinesis tiene lugar cuando las células casi han completado la fase S. Por ello, cuando se analiza por citometría el ciclo celular de un cultivo asincrónico, únicamente se detecta un pico que corresponde al contenido 2C de ADN.

Para analizar el papel de *SpPol4* en la reparación de DSB por NHEJ, se analizaron las sensibilidades del mutante *pol4Δ* sencillo y en un fondo carente de HR (doble mutante *pol4Δ rhp51Δ*) a diferentes daños en el ADN causado por los siguientes agentes genotóxicos:

- ❖ Radiación ionizante (IR): causa DSB
- ❖ Bleomicina: antibiótico que mimetiza los efectos de la radiación γ causando

principalmente DSB. Además, la bleomicina causa daño oxidativo en el ADN, aproximadamente el 40% del daño producido (Greenberg *et al.*, 2004).

- ❖ Luz ultravioleta (UV): causa distintos daños en el ADN, principalmente dímeros de timina.
- ❖ Hidroxiurea (HU): inhibidor de la síntesis de ADN *in vivo* ya que es un inhibidor de la ribonucleótido reductasa y, por lo tanto, inhibe la síntesis de dNTPs desde rNTPs.
- ❖ Camptotecina (CPT): agente genotóxico que interrumpe el procesamiento del ADN por la topoisomerasa I, provocando un aumento de las roturas en el ADN asociadas a la replicación.
- ❖ Etopósido: agente genotóxico que inhibe la síntesis de ADN a través de la inhibición de la topoisomerasa II, causando roturas de cadena doble y sencilla.
- ❖ Metil metanosulfonato (MMS): agente alquilante.
- ❖ Bromato potásico (KBrO_3): agente genotóxico causante de DSB asociadas a daño oxidativo, mayoritariamente 8-oxoG.

Como se resumió anteriormente, se puede inducir daño en el ADN de diferentes formas; bases dañadas, roturas de cadena simple y roturas de doble cadena. La mayoría de los agentes producen indirectamente DSB; los mecanismos de reparación de bases dañadas eliminan el daño por un mecanismo de escisión, es decir, generan un SSB que si se encuentra con la horquilla de replicación se transforma en un DSB. Por otro lado, cuando dos bases dañadas se encuentran muy próximas en cadenas opuestas del ADN, el mecanismo de reparación por escisión conduce a la formación de una DSB. Asimismo, se generan distintos tipos de DSB: DSB con extremos limpios o con extremos dañados que necesitarían ser procesados para ser reparados.

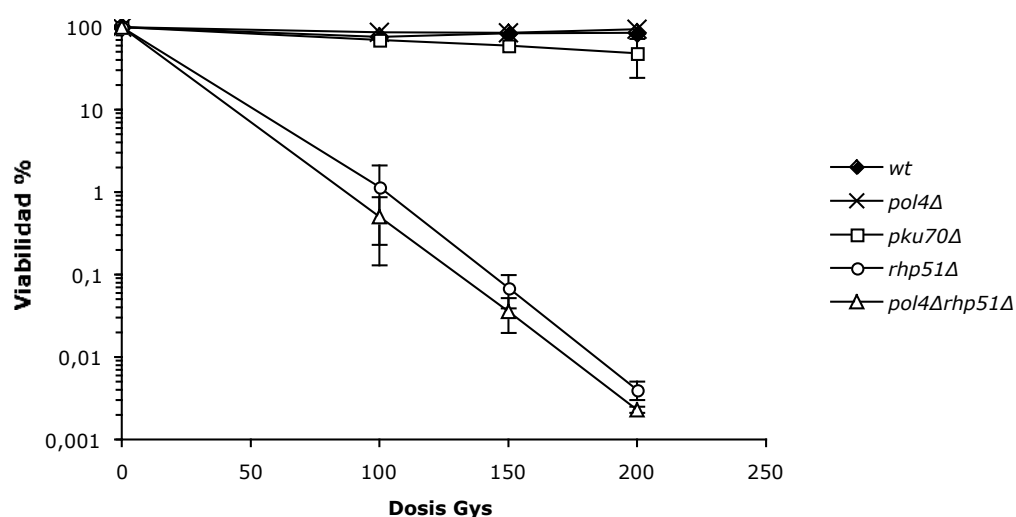


Figura 32. Análisis genético del mutante *pol4Δ* en respuesta a IR en *S. pombe*. Las cepas *wild-type* (rombos), *pol4Δ* (cruces), *pku70Δ* (cuadrados), *rhp51Δ* (círculos), y *pol4Δrhp51Δ* (triángulos) se cultivan hasta fase logarítmica, se les somete a distintas dosis de IR (100, 150 y 200 Gys) y se diluyen los cultivos sembrándose en placas de medio rico YES. Para determinar la desviación estándar se realizaron tres experimentos independientes por cepa.

Como puede observarse en las figuras 32 y 33, el mutante *pol4Δ* por sí sólo no presenta un aumento de la sensibilidad a radiación ionizante, bleomicina, etopósido, camptotecina, MMS, luz ultravioleta ni bromato potásico. Sin embargo, cuando se combina en un fondo carente de HR (doble mutante *pol4Δ rhp51Δ*) se observan distintos fenotipos dependiendo del tipo de daño causado. En respuesta a los daños causados por camptotecina, MMS, luz ultravioleta y bromato potásico, no se observa diferencia alguna entre la sensibilidad del doble mutante *pol4Δ rhp51Δ* con respecto al mutante sencillo *rhp51Δ*, lo que nos indica que la reparación utilizada para este tipo de daños es principalmente la HR. En cambio, en respuesta al daño causado por los agentes inductores de DSB; radiación ionizante, bleomicina y etopósido, se observa un aumento de la sensibilidad en el doble mutante *pol4Δ rhp51Δ* con respecto al mutante sencillo *rhp51Δ*. Estos resultados apoyarían un papel de *SpPol4* en la reparación por NHEJ de DSB, con extremos asociados o no a daño oxidativo.

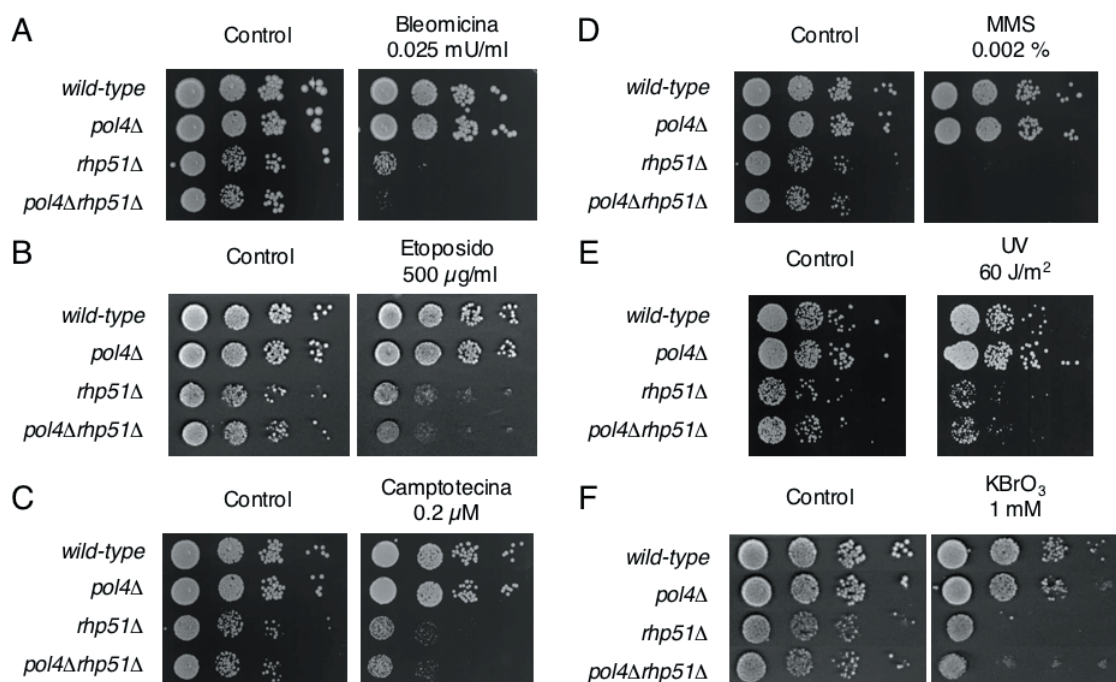


Figura 33. Análisis genético de mutantes *pol4Δ* en respuesta a distintos daños en el ADN en *S. pombe*. Las cepas *wild-type*, *pol4Δ*, *rhp51Δ* y *pol4Δrhp51Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} y estas diluciones se plaquean por goteo (4 μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con las dosis indicadas de los distintos daños: (A) Bleomicina (0.025 mU/ml); (B) Etopósido (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$); (C) Camptotecina (0.2 μM); (D) MMS (0.002%); (E) Luz ultravioleta (60 J/m^2); y (F) Bromato potásico (1 mM).

3.1.1. Efecto del daño en el ADN causado por la HU en el mutante *pol4Δ*

En *S. cerevisiae*, la recombinación requiere las proteínas del grupo epistático de Rad52, (Rad51, Rad52, Rad54/Rad55, Rad57, Rad59), ADN-RPA y la ligasa Cdc9. Rad52 es la proteína principal, requerida tanto para la recombinación Rad51-dependiente como para la recombinación Rad51-independiente (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002). A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. pombe* posee dos genes homólogos a *RAD52*, *rad22A⁺* y *rad22B⁺*, que participan en la recombinación mitótica y meiótica, respectivamente (Suto *et al.*, 1999; van den Bosch *et al.*, 2001).

Hasta el momento los fenotipos que se han encontrado del doble mutante *pol4Δ rhp51Δ* reflejaban un aumento de la sensibilidad con respecto al mutante sencillo *rhp51Δ*

en respuesta a determinados inductores de DSB. Sorprendentemente, la respuesta al daño causado por hidroxiiurea produce el efecto contrario. El doble mutante *pol4Δ rhp51Δ* revierte levemente el fenotipo del mutante sencillo *rhp51Δ* (**Figura 34**). Para estudiar más a fondo la causa de esta reversión se analizó la sensibilidad a hidroxiiurea de los mutantes *rad22Δ* y el doble mutante *pol4Δ rad22Δ*, ya que existe una vía de recombinación homóloga independiente de Rhp51 y dependiente de Rad22, denominada BIR (Doe & Whitby, 2004). Como se observa en la **figura 34**, el mutante *rad22Δ* y el doble mutante *pol4Δ rad22Δ* presentan la misma sensibilidad a hidroxiiurea. En ambos mutantes se ha eliminado por completo la recombinación homóloga, lo que les hace hipersensibles a hidroxiiurea. Este resultado nos indica que la reparación de las DSB del mutante *rhp51Δ* y del doble mutante *pol4Δ rhp51Δ* siguen la ruta de recombinación Rhp51-independiente. La presencia de *SpPol4* en el mutante *rhp51Δ* perjudica la viabilidad de este mutante debido a que su presencia induce algún tipo de daño en el ADN. Por esta razón, al eliminar *SpPol4* en el fondo *rhp51Δ* (doble mutante *pol4Δ rhp51Δ*) se mejora la viabilidad celular y la reparación del daño por la vía Rhp51-independiente. Sin embargo, al realizar el análisis genético de los genes homólogos en *S. cerevisiae*, los fenotipos fueron diferentes. Como se indica en la **figura 35**, el mutante *rad51Δ* y el doble mutante *pol4Δ rad51Δ* presentan la misma sensibilidad a hidroxiiurea. Resalta el hecho que para obtener la misma sensibilidad del mutante *rhp51Δ* de *S. pombe*, el mutante *rad51Δ* de *S. cerevisiae* necesita una concentración de HU 10 veces superior (25 mM frente a 2.5 mM). Este resultado indica que en ambas levaduras existe una diferencia significativa en cuanto a la tolerancia al daño por HU, siendo *S. pombe* especialmente sensible. Como puede observarse en la **figura 34**, el mutante sencillo *pol4Δ* parece estar menos afectado al tratamiento con hidroxiiurea que la cepa silvestre. De todo lo dicho anteriormente se puede deducir que la acción de *SpPol4* está contribuyendo a la sensibilidad a HU de *S. pombe*, mientras que *ScPol4* parece no estar implicada en la sensibilidad a HU de *S. cerevisiae*.

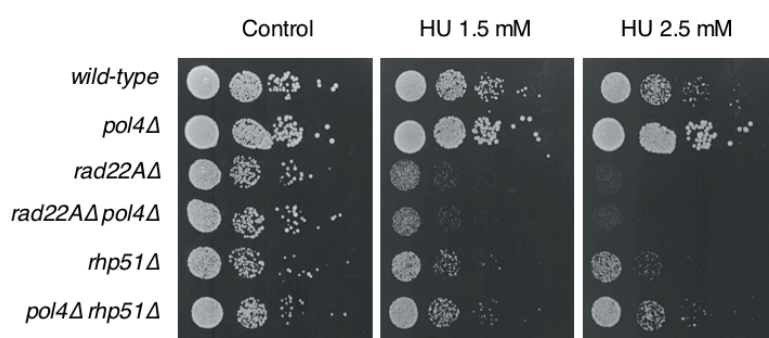


Figura 34. Análisis genético de mutantes *pol4Δ* en respuesta a HU en *S. pombe*. Las cepas *wild-type*, *pol4Δ*, *rhp51Δ* y *pol4Δrhp51Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} , y estas diluciones se plaquean por goteo (4 μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con las dosis indicadas de HU.

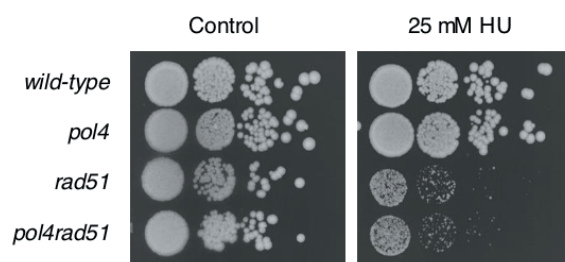


Figura 35. Análisis genético de mutantes *pol4Δ* en respuesta a HU en *cerevisiae*. Las cepas *wild-type*, *pol4Δ*, *rhp51Δ* y *pol4Δrhp51Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} , y estas diluciones se plaquean por goteo (4 μl) en placas de medio rico YPD (control) y placas con las dosis indicadas de HU.

3.2. Efecto de la Radiación Ionizante en la Fase G1 del Ciclo Celular

Estudios previos han demostrado en *S. pombe*, que mutantes carentes en NHEJ no son sensibles a distintos agentes que causan daño en el ADN (Manolis *et al.*, 2001). Esto es debido a la pequeña proporción existente en un cultivo asincrónico de células en fase G1. En células de *S. pombe* sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular mediante la eliminación del N₂ del medio, se observa una preferencia de la reparación de DSB por NHEJ sobre HR (Ferreira & Cooper, 2004). Como se ha visto, el mutante *pol4Δ* en un cultivo asincrónico no es sensible a ningún agente genotóxico analizado. Entonces, se decidió utilizar células sincronizadas en G1 para estudiar la sensibilidad a IR del mutante *pol4Δ* sencillo y en un fondo carente de NHEJ (*pku70Δ*).

Como se muestra en la **figura 36.A**, en fase logarítmica de crecimiento la viabilidad de los mutantes *pol4Δ*, *pku70Δ* y *pol4Δ pku70Δ* es similar a la cepa silvestre. Al eliminar el N₂ del medio, sincronizando las células en G1, como se explica en Materiales y Métodos, la viabilidad de los mutantes decae ligeramente (**Figura 36.B**). El mutante *pol4Δ* se comporta igual que la cepa silvestre, mientras que en el mutante *pku70Δ* la viabilidad disminuye frente a la cepa silvestre, cayendo aún más en el doble mutante *pol4Δ pku70Δ* (**Figura 36.B**). Este resultado implica que Pku70 y SpPol4 pueden no estar en la misma ruta de reparación, pero que SpPol4 estaría participando en la reparación de DSB en G1.

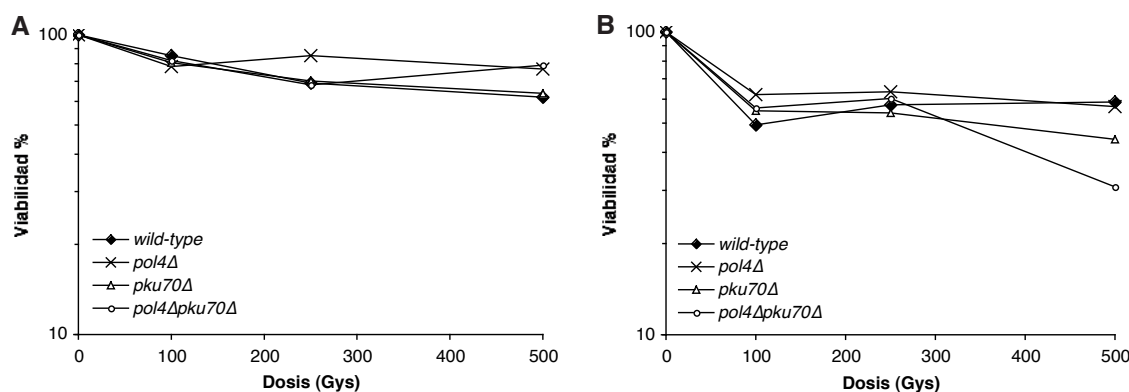


Figura 36. Análisis genético del mutante *pol4Δ* en respuesta a IR en la fase G1. (A) Las cepas *wild-type* (rombos), *pol4Δ* (cruces), *pku70Δ* (triángulo) y *pol4Δpku70Δ* (círculos) se cultivan hasta fase logarítmica a 30°C, se les somete a distintas dosis de IR (100, 250 y 500 Gys) y se diluyen los cultivos sembrándose en placas de medio rico YES. (B) Los cultivos sincronizados en la fase G1 mediante la eliminación del N₂ del medio se preparan como se describe en Materiales y Métodos. Las células se someten a distintas dosis de IR (100, 250 y 500 Gys) y se diluyen los cultivos sembrándose en placas de medio rico YES.

En paralelo, se utilizó otra estrategia para estudiar la función de SpPol4 en la reparación de DSB en la fase G1 del ciclo celular. El gen *wee1⁺* codifica una proteína quinasa que actúa como inhibidor de la mitosis, ya que se encarga de retrasar el avance del ciclo celular en la fase G2 hasta que la célula alcanza el tamaño adecuado para entrar en mitosis. Mutantes en el gen *wee1⁺* inician la mitosis y la división celular con la mitad de tamaño que las células *wild-type* (Nurse, 1975; Russell & Nurse, 1987). Como indica la **figura 37.A**, el mutante termosensible *wee1-50* al incubarse a la temperatura restrictiva de 36°C, alarga la fase G1 hasta que la célula alcance el tamaño mínimo requerido para superar el punto de control celular de la fase G1 y progresar en el ciclo. Se analizó la sensibilidad a IR del mutante *pol4Δ* en el fondo *wee1-50* (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la **figura 37.B**, en células en crecimiento logarítmico a

25°C (condiciones similares a la cepa *wild-type*) la viabilidad de ambas cepas es la misma. Sin embargo, la viabilidad en células sincronizadas en la fase G1 por eliminación del N₂ del medio del mutante *wee1-50 pol4Δ* disminuye frente al mutante *wee1-50*. Este resultado sugiere la participación de SpPol4 en el mecanismo de reparación de DSB en la fase G1 del ciclo celular.

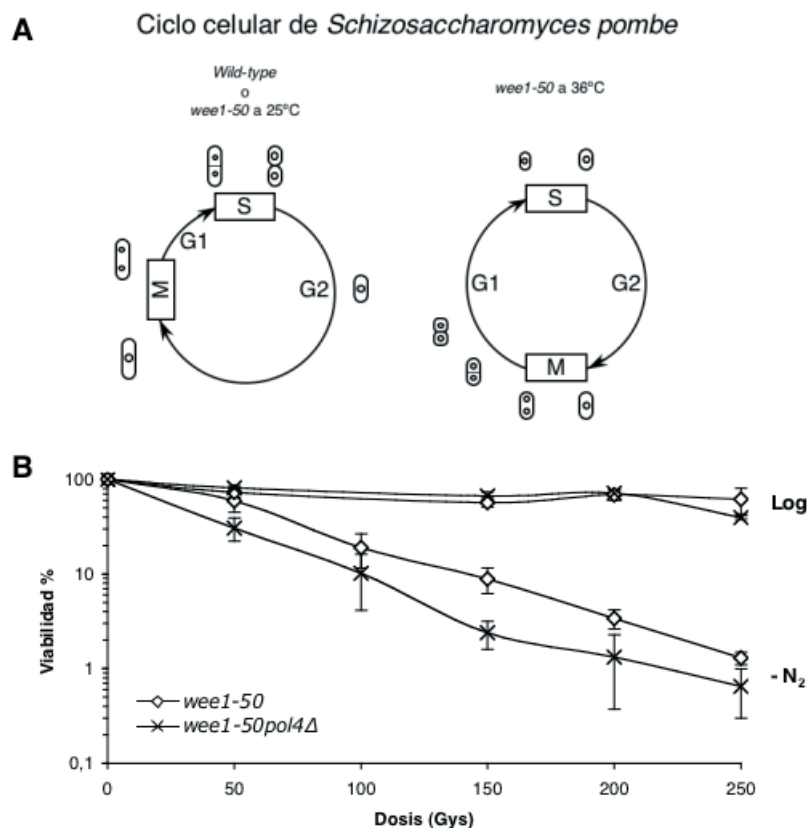


Figura 37. Análisis genético del mutante *pol4Δ* en respuesta a IR en el fondo *wee1-50*. (A) Células *wild-type* o *wee1-50* a 25 °C presentan una fase G1 del ciclo celular muy corta. Las células *wee1-50* a 36°C entran en mitosis con un tamaño celular reducido y, en consecuencia, presentan una fase G1 extendida hasta que alcanzan el tamaño mínimo para progresar en el ciclo celular. (B) Las cepas *wee1-50* (rombos) y *wee1-50 pol4Δ* (cruces) se cultivan hasta fase logarítmica a 25°C o se sincronizan en G1 mediante la eliminación del N₂ del medio se preparan como se describe en Materiales y Métodos. Las células se someten a distintas dosis de IR (50, 100, 150, 200 y 250 Gys), se diluyen los cultivos sembrándose en placas de medio rico YES e incubándolos a 36°C.

Los resultados expuestos hasta el momento no demuestran claramente la implicación de SpPol4 en el mecanismo de reparación de NHEJ. Sería necesario el empleo de otras aproximaciones, como pueden ser ensayos de reparación de ADN extracromosómico e incluir en el análisis otras proteínas implicadas en el NHEJ de *S. pombe* como la Ligasa 4, con el fin de establecer un requerimiento de la actividad ADN polimerasa, que permitiese evaluar más exhaustivamente el papel de SpPol4 en NHEJ.

3.3. Efecto de agentes inductores de daño en el ADN en el mutante *pku70Δ*

Estudios anteriores en levaduras muestran que la supervivencia de las células a la inducción de DSB depende exclusivamente de HR, mientras que mutantes en el mecanismo de NHEJ eran resistentes a DSB (Siede *et al.*, 1996; Manolis *et al.*, 2001). En *S. pombe*, el mecanismo de reparación de DSB por NHEJ es dependiente de Pku70. Sin

embargo, el mutante *pku70Δ* presenta resistencia a IR, MMS y bleomicina (Manolis *et al.*, 2001). El trabajo de Ferreira & Cooper (2004) muestra que los niveles de reparación de DSB por NHEJ aumentan durante la fase G1 del ciclo celular.

Nuestros resultados confirman la resistencia del mutante *pku70Δ* a IR, bleomicina y MMS, mientras que el mutante carente de HR, *rhp51Δ*, es muy sensible a los mismos daños. También se confirma en este capítulo los resultados de otros estudios que muestran que la viabilidad del mutante *pku70Δ* a IR en células sincronizadas en la fase G1 mediante eliminación del N₂ del medio decae con respecto a la cepa silvestre. Se realizó un estudio paralelo de las sensibilidades de los mutantes *pku70Δ* y *rhp51Δ* respecto a distintos daños en el ADN (Figura 38). Mientras que el mutante *rhp51Δ* es sensible a todo tipo de daño en el ADN, el mutante *pku70Δ* se muestra resistente en todos los casos a excepción del bromato potásico. La sensibilidad del mutante *pku70Δ* es comparable a la del mutante *rhp51Δ*, este resultado nos indica que tanto la HR como el NHEJ están participando en la reparación del daño inducido por el bromato potásico en un cultivo asincrónico de *S. pombe*. Un estudio más a fondo del daño causado por el bromato potásico se realiza en el capítulo siguiente.

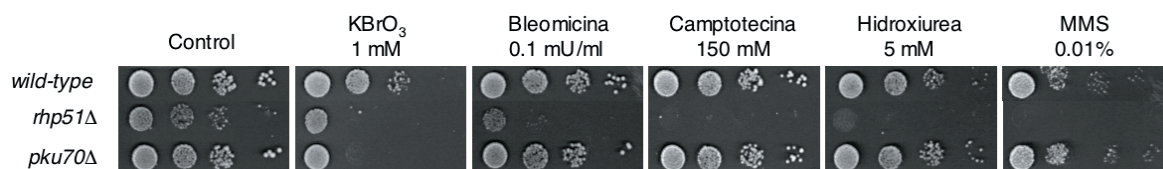


Figura 38. Análisis genético del mutante *pku70Δ* en respuesta a distintos daños en el ADN en *S. pombe*. Las cepas *wild-type*, *rhp51Δ* y *pku70Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10⁶ hasta 10³ células ml⁻¹, y estas diluciones se plaquean por goteo (4μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con las dosis indicadas de los distintos daños: bromato potásico (1 mM), bleomicina (0.1 mU/ml), camptotecina (150 mM), hidroxiurea (5 mM) y MMS (0.01%).

IV. Mecanismos de reparación y tolerancia al daño oxidativo en el ADN

Las especies de oxígeno reactivas (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), son producto del metabolismo celular o de la exposición a agentes ambientales, tales como la radiación o el humo del tabaco (Lindahl & Wood, 1999). El daño oxidativo producido por ROS en el ADN induce roturas de cadena simple (SSB), roturas de doble cadena (DSB), sitios abásicos y bases modificadas. Los distintos organismos han elaborado numerosas estrategias para defenderse del daño oxidativo producido por ROS. En primer lugar, la inactivación enzimática de ROS, como la inactivación enzimática del radical superóxido por la superóxido dismutasa y del peróxido de hidrógeno por la acción de la catalasa. En segundo lugar, la acción de una nucleótido hidrolasa que transforma el nucleótido alterado en su correspondiente dNMP antes de que sea usado como sustrato en la replicación. Por último, la reparación del daño oxidativo por medio de distintos mecanismos de reparación del ADN, entre los que se incluyen: la reparación por escisión de base (BER), la reparación por escisión de nucleótido (NER), la reparación de apareamientos erróneos (MMR), la síntesis a través de lesiones (TLS), la recombinación homóloga (HR) y la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Entre ellos, el mecanismo de BER es la ruta mayoritaria de reparación del daño oxidativo en el ADN (Boiteux *et al.*, 2002; Slupphaug *et al.*, 2003).

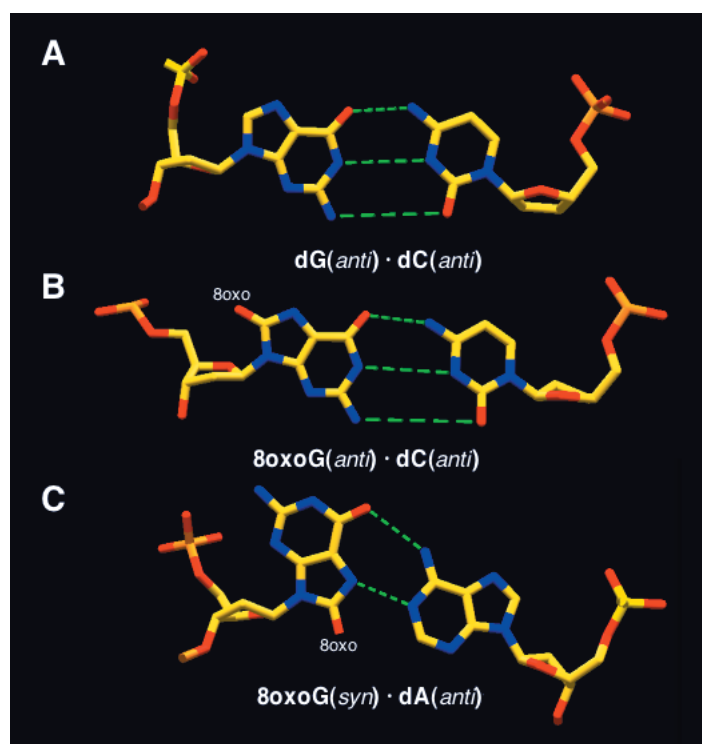


Figura 39. Estructura de los apareamientos posibles teniendo como base molde 8oxoG. **(A)** Apareamiento de Watson-Crick entre las bases dG y dC. Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. **(B)** Estructura del apareamiento entre las bases 8-oxoG y dC (PDB: 1U48). **(C)** Estructura del apareamiento entre las bases 8-oxoG y dA (PDB: 178D). La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex *et al.*, 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

Las bases nitrogenadas del ADN son especialmente susceptibles a la oxidación mediante ROS, siendo la guanina particularmente vulnerable (Neeley & Essigmann, 2006). Una de las modificaciones más comunes de la guanina es la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), que se genera entre 10^3 y 10^4 veces por célula y día (Beckman & Ames, 1997; Helbock *et al.*, 1998). Esta lesión es muy estable y altamente mutagénica, ya que produce transversiones G·C→T·A (Moriya, 1993). Desde el punto de vista biológico, la base 8-oxoG es el producto más importante del daño oxidativo en el ADN. La base 8-oxoG aparea tanto con la base nitrogenada citosina como con la adenina (Figura 39). En el par de bases 8-oxoG·dCMP (Figura 39.B), el enlace glicosídico de ambas bases nitrogenadas se encuentran en configuración *anti* y el par de bases está estabilizado por tres puentes de hidrógeno (Oda *et al.*, 1991; Lipscomb *et al.*, 1995). En cambio, en

el par de bases 8-oxoG-dAMP (Figura 39.C), el enlace glicosídico de la base 8-oxoG se encuentra en configuración *syn* y forma un apareamiento tipo Hoogsteen con dos puentes de hidrógeno con la adenina (Kouchakdjian *et al.*, 1991; McAuley-Hecht *et al.*, 1994). Además, a pesar de la presencia de ambos pares de bases modificados en el ADN, éste sigue presentando una configuración tipo B (Kouchakdjian *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 1991; McAuley-Hecht *et al.*, 1994; Lipscomb *et al.*, 1995), aunque en el caso del par 8-oxoG-dCMP el esqueleto carbonado del ADN sufre ciertas perturbaciones (Lipscomb *et al.*, 1995).

A la vista de la importancia como lesión mutagénica de la base 8-oxoG, todos los organismos han evolucionado hacia estrategias que eviten la mutagénesis que provoca esta lesión. El mecanismo de BER es la ruta mayoritaria de reparación de la base 8-oxoG, estando conservado desde bacterias a mamíferos. El primer modelo propuesto fue en *E. coli* y se denominó mecanismo GO (Figura 40). En él están implicadas tres enzimas: MutT, MutM y MutY, que presentan sus correspondientes homólogos en mamíferos, MTH1, OGG1 y MYH, respectivamente. MutT (MTH1) es una 8-oxodGTPasa, la cual hidroliza el desoxinucleótido trifosfato 8-oxodGTP en su correspondiente monofosfato, impidiendo de este modo su incorporación en el ADN por las polimerasas replicativas. Cuando esta lesión se encuentra en el ADN se repara mediante BER, la base 8-oxoG es eliminada por la acción de una 8-oxoG ADN glicosilasa, MutM (OGG1), que elimina el 8-oxoG del par 8-oxoG-dCMP generando un sitio abásico que se procesa por las enzimas implicadas en el mecanismo de BER obteniendo el par correcto G-C. Sin embargo, si la replicación tiene lugar, la ADN glicosilasa MutY (MYH) elimina la base adenina del par 8-oxoG-dAMP. El sitio abásico generado es procesado, dando una nueva oportunidad a la polimerasa para restaurar el par 8-oxoG-dCMP que pueda ser sustrato de MutM (OGG1) (Hazra *et al.*, 2001; David *et al.*, 2007).

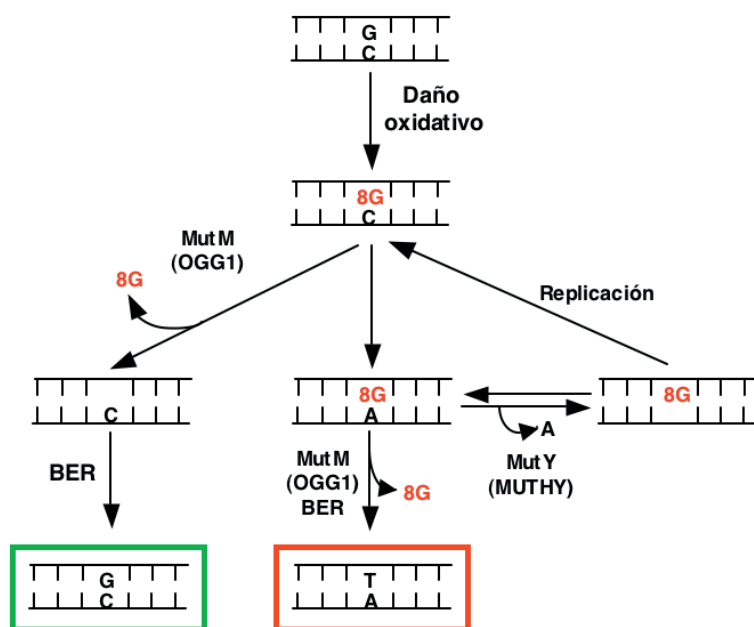


Figura 40. Mecanismo GO de reparación de la base 8-oxoG en *E. coli* y células de mamífero. La presencia de la base 8-oxoG en el ADN causa transversiones G-C→T-A, como se representa en la ruta central. En *E. coli*, la ADN glicosilasa MutM elimina la base 8-oxoG del ADN, MutY elimina la base A del par 8-oxoG-A. OGG1 y MUTHY en células de mamífero, respectivamente. Ambas generan sitios abásicos en el ADN los cuales bien se reparan por el mecanismo de BER o bien entran en un nuevo ciclo de replicación.

En cambio, en *S. cerevisiae* únicamente se ha identificado un homólogo funcional de MutM (OGG1): una 8-oxoG ADN glicosilasa denominada Ogg1 (van der Kemp *et al.*, 1996), no habiéndose identificado ningún homólogo de MutT (MTH1) ni de MutY (MYH). Esta observación nos indica que *S. cerevisiae* ha desarrollado estrategias alternativas para evitar el efecto mutagénico de la base 8-oxoG. De hecho, el mecanismo de MMR actuaría como un análogo funcional de MutT y MutY, encargándose de

eliminar la base adenina del par 8-oxoG·dAMP, dando así otra oportunidad a la reparación no mutagénica. Por lo tanto *S. cerevisiae* utiliza al menos tres estrategias para prevenir la mutagénesis inducida por la base 8-oxoG: i) la eliminación de la base 8-oxoG mediante el mecanismo de BER utilizando la ADN glicosilasa Ogg1 y con el mecanismo de NER como ruta alternativa, ii) la eliminación de la base adenina incorporada frente al 8-oxoG por el mecanismo de MMR y iii) la incorporación de la base correcta, citosina, frente al 8-oxoG por la Pol η mediante un mecanismo de TLS (Boiteux *et al.*, 2002).

En el caso de *S. pombe* no se ha identificado ningún homólogo de MutT (MTH1) aunque, a diferencia de *S. cerevisiae*, presenta un homólogo funcional de MutY (MYH), denominado Myh1 (Lu & Fawcett 1998). Tampoco se ha identificado ningún homólogo de MutM (OGG1), pero se ha propuesto que el enzima bifuncional Nth1 (ADN glicosilasa/ AP liasa) se encarga de eliminar la base 8-oxoG del ADN (Yonekura *et al.*, 2007). Por lo tanto, dada la importancia biológica del daño causado por la base 8-oxoG y la escasez de datos de la reparación de esta lesión en *S. pombe*, se procedió al estudio de los mecanismos desarrollados por esta levadura para combatir el efecto mutagénico de esta lesión, además de estudiar la implicación de SpPol4 en los mismos. Para ello, se analizó el papel de los mecanismos de BER, TLS y NHEJ, junto a SpPol4, en la reparación y tolerancia al daño 8-oxoG en el ADN mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*.

1. ANÁLISIS GENÉTICO DE MUTANTES DE *Schizosaccharomyces pombe* EN LA RUTA DE BER EN RESPUESTA A DAÑO OXIDATIVO

Dado que el mecanismo de BER es la ruta mayoritaria de reparación de la base 8-oxoG, se realizó un análisis genético de mutantes en BER de *S. pombe* en respuesta al daño oxidativo inducido por bromato potásico (KBrO₃). Se conoce que KBrO₃ es un agente inductor de daño oxidativo que produce específicamente 8-oxoG (Ballmaier & Epe, 2006; Kawanishi & Murata, 2006). Además, se ha establecido una relación lineal entre la generación de 8-oxoG y concentraciones crecientes de KBrO₃ en diferentes líneas celulares humanas, no detectándose utilizando otros agentes inductores de daño en el ADN como el MMS (Mangal *et al.*, 2009). La sensibilidad de los mutantes a KBrO₃ se evaluó sometiendo a las células a un daño crónico (test de gota) utilizando distintas dosis de KBrO₃, como se indica en Materiales y Métodos. Se llevó en paralelo el análisis genético de los mismos mutantes, al igual que el realizado en el capítulo I de esta Tesis doctoral, en respuesta al daño inducido por MMS reparado por BER.

Como muestra la **figura 41**, la reparación de la base 8-oxoG inducida por KBrO₃ sigue el mecanismo de reparación BER previamente descrito en respuesta a MMS (Alseth *et al.*, 2004). Apn2 tiene una función importante en el BER inducido por KBrO₃, ya que el mutante *apn2Δ* es hipersensible. Además, esta hipersensibilidad se ve aliviada por la delección adicional del gen *nth1*⁺ (doble mutante *nth1Δ apn2Δ*), indicando que ambas enzimas participan en la misma ruta de reparación, actuando Nth1 en primer lugar delante de Apn2. Sin embargo, a diferencia de la respuesta a MMS, se observa que tanto el mutante *apn2Δ* como el mutante *rad2Δ* son hipersensibles a KBrO₃. Este resultado nos indica que en la reparación de la base 8-oxoG, el BER de trecho largo tiene el mismo peso que el BER de trecho corto.

A pesar de no tener una ADN glicosilasa específica que elimine el 8-oxoG, *S. pombe* sigue el mecanismo de BER para su reparación. Nth1, como se ha descrito en

Yonekura *et al* (2007), podría ser capaz de eliminar la base dañada 8-oxoG generando un sitio abásico o bien la reparación sigue un mecanismo de BER independiente de glicosilasa, denominado reparación por incisión de nucleótido (NIR). Se ha descrito la implicación del mecanismo de NIR en la reparación del daño oxidativo, siendo una alternativa a la reparación de 8-oxoG por BER dependiente de Ogg1 en *S. cerevisiae* (Ishchenko *et al.*, 2005).

Al igual que los resultados obtenidos anteriormente en esta Tesis para otros agentes inductores de daño en el ADN, el mutante *pol4Δ* no muestra un aumento de la sensibilidad al daño inducido por KBrO_3 respecto a la cepa silvestre. De forma análoga a los resultados obtenidos en respuesta a MMS, cuando ambas rutas del BER se bloquean simultáneamente (doble mutante *nth1Δ rad2Δ*), la sensibilidad a MMS aumenta significativamente, incrementándose con la delección adicional del gen *pol4⁺* (triple mutante *nth1Δ rad2Δ pol4Δ*) (**Figura 41**). Por lo tanto, *SpPol4*, basándose en su actividad dRP liasa, podría tener un papel auxiliar en la reparación del daño por KBrO_3 en *S. pombe*, equivalente al mecanismo de reparación BER de trecho corto utilizado en mamíferos. Por otro lado, si delecionamos adicionalmente el gen *pol4⁺* en el mutante *nth1Δ* (doble mutante *nth1Δ pol4Δ*), *apn2Δ* (doble mutante *apn2Δ pol4Δ*) y *rad2Δ* (doble mutante *rad2Δ pol4Δ*), se observa una clara reversión de la sensibilidad de sus mutantes sencillos *nth1Δ*, *apn2Δ* y *rad2Δ*, respectivamente. Este resultado sugiere que *SpPol4* participa en otro mecanismo diferente de BER, el cual es potencialmente mutagénico.

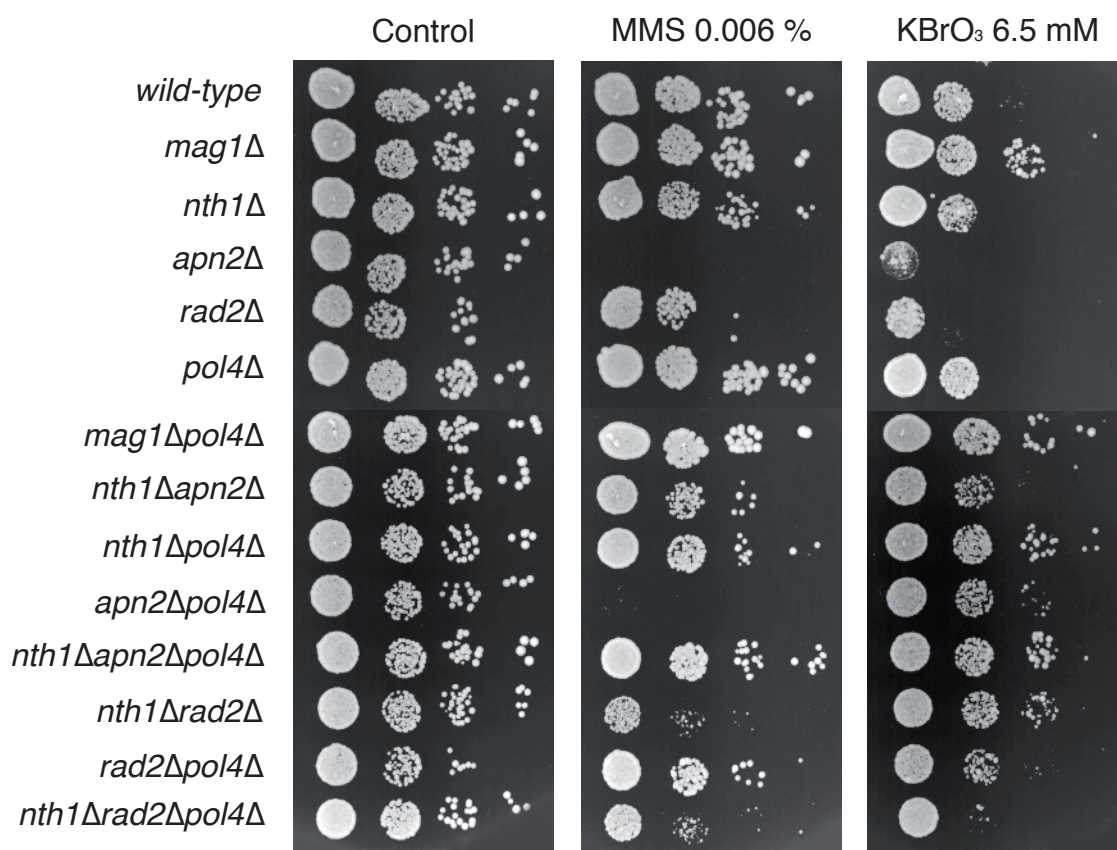


Figura 41. Análisis genético de mutantes BER en respuesta a KBrO_3 y MMS en *S. pombe*. Las cepas *wild-type*, *mag1Δ*, *nth1Δ*, *apn2Δ*, *rad2Δ*, *pol4Δ*, *mag1Δpol4Δ*, *nth1Δapn2Δ*, *nth1Δpol4Δ*, *apn2Δpol4Δ*, *nth1Δapn2Δpol4Δ*, *nth1Δrad2Δ*, *rad2Δpol4Δ* y *nth1Δrad2Δpol4Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10^6 hasta 10^3 células ml^{-1} , estas diluciones se plaquean por goteo (4 μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con las dosis de KBrO_3 y MMS indicadas.

2. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE SÍNTESIS A TRAVÉS DE LESIONES (TLS) EN RESPUESTA A LA GENERACIÓN DE 8-OXOG

Las lesiones en las bases nitrogenadas a menudo bloquean el progreso de la horquilla de replicación, pero gracias a ADN polimerasas especializadas es posible llevar a cabo la síntesis a través de estas lesiones y continuar con el proceso de replicación. Por lo tanto, la capacidad de síntesis a través de lesiones acoplada al proceso de replicación tiene una importancia crucial para la célula. Tales ADN polimerasas son los miembros de la familia γ y $\text{Pol}\zeta$, perteneciente a la familia B (revisado por Prakash *et al.*, 2005). La aparición de una base 8-oxoG en el ADN no bloquea la replicación, las ADN polimerasas son capaces de incorporar dC o dA frente al 8-oxoG en la hebra molde. Las ADN polimerasas asociadas a la replicación, como $\text{Pol}\delta$, tienden a incorporar dA frente a 8-oxoG, mientras que las ADN polimerasas implicadas en la reparación del ADN, como $\text{Pol}\beta$, tienden a incorporar dC, el nucleótido correcto, frente a la lesión (Grollman & Moriya, 1993). En *S. cerevisiae*, $\text{Pol}\delta$ es la principal polimerasa replicativa e incorpora exclusivamente dA frente a 8-oxoG (Haracska *et al.*, 2000). En cambio, $\text{Pol}\eta$ (Rad30), polimerasa implicada en TLS, prefiere incorporar dC frente a la lesión. De este modo, $\text{Pol}\eta$ participa en la prevención de la mutagénesis inducida por 8-oxoG (Haracska *et al.*, 2000; Yuan, *et al.*, 2000).

Curiosamente, en *S. pombe*, el gen *eso1⁺* codifica una proteína esencial que contiene dos dominios. Dos terceras partes de su región N-terminal codifica la ADN polimerasa $\text{Pol}\eta$ y una tercera parte de su región C-terminal codifica la proteína Ctf7 (también denominada Eco1), una proteína esencial en la cohesión de cromátidas hermanas durante la fase S del ciclo celular (Tanaka *et al.*, 2000). Este dato indica que Eso1 tiene un doble papel en replicación. A pesar de estar codificadas en el mismo gen, cada una conserva sus respectivas funciones en la cohesión de cromátidas hermanas y en la síntesis a través de lesiones (Madril *et al.*, 2001). Aunque en otras especies las dos proteínas están codificadas por genes diferentes, ambas podrían asociarse *in vivo*, y de esta forma modular la función de una de ellas o de ambas. Además, el gen *eso1⁺* interacciona genéticamente con el gen *pcn1⁺*, el cual codifica el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (Tanaka *et al.*, 2000). El PCNA funciona como un andamio donde varias ADN polimerasas se unen y de esta forma, acceden juntas a la lesión durante la replicación para cumplir con su función de reparación. La interacción con el PCNA es una característica de las ADN polimerasas implicadas en TLS (revisado por Prakash *et al.*, 2005).

En los últimos años, numerosos estudios han implicado a las ADN polimerasas de la familia X, $\text{Pol}\beta$ y $\text{Pol}\lambda$, en los mecanismo de reparación de la lesión 8-oxoG (Maga *et al.*, 2002; Blanca *et al.*, 2004; Maga *et al.*, 2007; Picher & Blanco, 2007; Maga *et al.*, 2008). Mientras $\text{Pol}\beta$ tiende a incorporar dC, el nucleótido correcto, frente a la lesión, $\text{Pol}\lambda$ incorpora dA y dC frente a 8-oxoG (Grollman & Moriya, 1993). Sin embargo, en presencia de PCNA y de RPA, $\text{Pol}\lambda$ aumenta la eficiencia de incorporación de dC frente a dA (Maga *et al.*, 2007). Además $\text{Pol}\lambda$ tiende mayoritariamente a extender el par correcto 8-oxoG-dC (Picher & Blanco, 2007).

Por lo dicho anteriormente, se evaluó el papel de Eso1 (*SpPol* η) y *SpPol*4 en el paso de inserción frente a la base modificada 8-oxoG. Se utilizó como sustrato una molécula molde/cebador abierto (Figura 42) que simula la estructura de un intermedio de replicación, proceso en el que se produce el fenómeno de síntesis a través de lesiones con el fin de evitar la parada del proceso de replicación del ADN. Como se observa

en la **figura 42**, tanto *Eso1* como *SpPol4* realizan la inserción dirigida por la primera base del molde (dG). Sin embargo, ambas polimerasas presentan un comportamiento diferente al evaluar la síntesis frente a la base 8-oxoG. *Eso1* introduce dC (nucleótido correcto) frente a la base 8-oxoG de manera muy eficiente, mientras que la inserción de dA presenta una eficiencia muy baja. En cambio, *SpPol4* introduce dA (nucleótido incorrecto) frente a la base 8-oxoG de manera muy eficiente, mientras que la inserción correcta (dC) presenta una eficiencia muy baja (no visible en la **figura 42**). *SpPol4* también es capaz de realizar una leve inserción de dG mediada probablemente por un mecanismo de dislocación de la cadena molde (no visible en la **figura 42**).

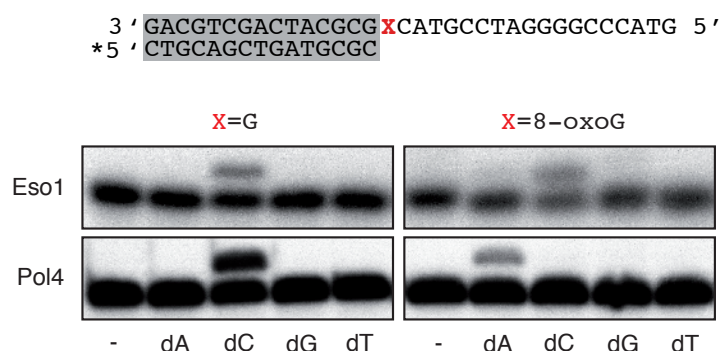


Figura 42. Ensayo de inserción de *Eso1* y *SpPol4* frente a la base nitrogenada 8-oxoG. El esquema representa la secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM ADN y aproximadamente 100 nM de cada ADN polimerasa. La concentración de dNTPs es de 10 mM para *Eso1* y de 1 mM para *SpPol4*.

Los resultados obtenidos abren la posibilidad de que *SpPol4* pueda participar en el paso de inserción frente a 8-oxoG en procesos de TLS. El paso de extensión de un par en el que una de las bases se encuentra modificada tiene gran relevancia, ya que de la eficiencia de este proceso depende que el par generado durante el proceso de inserción quede fijado e inaccesible a proteínas con actividad 3'→5' que podrían eliminar el nucleótido insertado. Este hecho tiene dos lecturas posibles. Si el par generado durante el paso de inserción está libre de error interesará que el paso de extensión sea lo más eficiente posible, mientras que si en el paso de inserción se realizó una adición mutagénica interesará que el paso de extensión sea lo menos eficiente posible, para que la adición mutagénica pueda corregirse antes de la extensión. Por lo tanto, en el paso de extensión será de nuevo muy relevante tanto la fidelidad de extensión (tendencia a extender el par no mutagénico respecto al mutagénico), como la eficiencia de extensión (eficiencia relativa de extensión de los pares mutagénicos y no mutagénicos respecto a la extensión de un par no dañado).

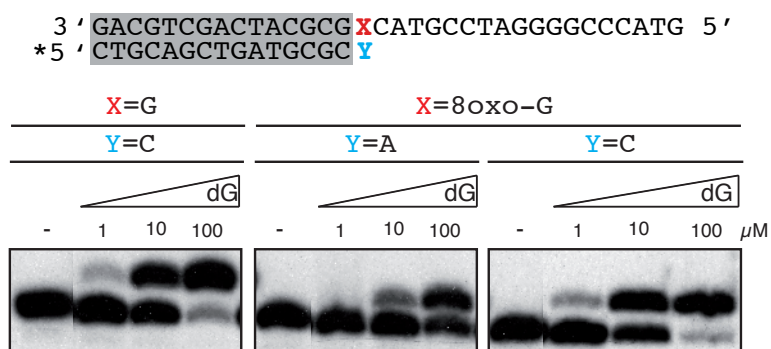


Figura 43. Ensayo de extensión desde pares con la base 8-oxoG como molde de *SpPol4*. El esquema representa la secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Ensayo de extensión de los posibles pares formados con dG y 8-oxoG como base molde por *SpPol4*. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM ADN y 100 nM de ADN polimerasa. Las concentraciones utilizadas de dGTP se detallan en la figura.

SpPol4 realiza muy eficientemente la extensión de un par dG·dC. Mientras que la extensión de los posibles pares generados durante el paso de inserción frente a una base modificada 8-oxoG (8-oxoG·dC y 8-oxoG·dA) varía. Al igual que Pol λ (Picher & Blanco, 2007), *SpPol4* muestra una mayor eficiencia de extensión en el caso del par 8-oxoG·dC respecto al par 8-oxoG·dA (Figura 43). En cambio, al evaluar la capacidad de extensión de Eso1 se observó que la eficiencia de extensión del par 8-oxoG·dC y 8-oxoG·dA fué similar (datos no mostrados). Por lo tanto, *SpPol4* tiene una alta fidelidad de extensión, ya que tiende mayoritariamente a extender el par correcto 8-oxoG·dC, mientras que Eso1 no discrimina entre el par correcto (8-oxoG·dC) y el par incorrecto (8-oxoG·dA).

3. NHEJ DE EXTREMOS OXIDADOS

La posible implicación de *SpPol4* en el proceso de reparación de DSB mediante el mecanismo de NHEJ, junto con los datos expuestos en el apartado anterior, abren la posibilidad que *SpPol4* participe en procesos de síntesis a través de lesiones no acoplados a la replicación del ADN. Los agentes endógenos y exógenos que causan daño oxidativo inducen una combinación de distintas bases dañadas en la misma zona del ADN, generando así sitios con múltiples daños (*Multiple Damage Sites*, MDS). El procesamiento para la reparación de las bases dañadas en MDS por BER puede derivar en la formación de DSB, lo cual dificulta la reparación del daño (Harrison *et al.*, 1999). Por lo tanto, las ADN polimerasas implicadas en la reparación de DSB puede que tengan que realizar eventos de síntesis frente a bases nitrogenadas modificadas para favorecer la conexión de los extremos y su posterior ligación. KBrO₃ además de 8-oxoG, induce DSB, por lo que es capaz de generar un daño combinado, DSB asociado a lesiones 8-oxoG de las bases adyacentes a la rotura (Luan *et al.*, 2007).

Como se ha mostrado en el capítulo III de esta Tesis doctoral, la sensibilidad a KBrO₃ del mutante *pku70Δ* (ausencia de NHEJ) es comparable a la del mutante *rhp51Δ* (ausencia de HR), indicándonos que tanto la HR como el NHEJ están participando en la reparación del daño inducido por el bromato potásico en un cultivo asincrónico de *S. pombe*. Sorprendentemente, cuando se deletiona adicionalmente el gen *pol4*⁺ (doble mutante *pol4Δ pku70Δ*), se revierte la sensibilidad del mutante sencillo *pku70Δ* (Figura 44). Este resultado apoya el resultado anterior que indica que *SpPol4* inserta frente a 8-oxoG la base incorrecta, dA. *SpPol4* induciría mutaciones en el proceso de reparación de DSB, conduciendo a la muerte celular.

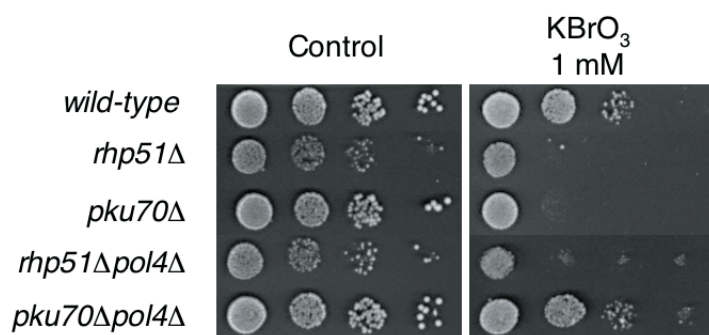


Figura 44. Análisis genético del mutante *pku70Δ* en respuesta a KBrO₃ en *S. pombe*. Las cepas *wild-type*, *rhp51Δ*, *pku70Δ* y *pol4Δpku70Δ* crecen hasta fase logarítmica. De cada cultivo se hacen diluciones seriadas desde 10⁶ hasta 10³ células ml⁻¹, y estas diluciones se plaquean por goteo (4 μl) en placas de medio rico YES (control) y placas con 1 mM de KBrO₃.

En este sentido, sería muy interesante evaluar la capacidad de inserción y extensión de *SpPol4* frente a bases modificadas susceptibles de ser intermedios de NHEJ, como podrían ser moléculas con extremos 3' protuberantes, en los que algunas de las bases estuviera modificada. También sería interesante evaluar la influencia de los factores de la ruta de NHEJ, como son las proteínas Ku70, Ku80, Xlf1 y ligasa 4, en el resultado de la síntesis frente a bases dañadas.

DISCUSIÓN

1. LAS ADN POLIMERASAS

Las ADN polimerasas son las enzimas clave en la replicación y reparación del ADN. El conocimiento de la complejidad de estos procesos ha aumentado significativamente durante los últimos años por el descubrimiento de un gran número de ADN polimerasas. Actualmente se han identificado cinco polimerasas en *E. coli* y al menos ocho en *S. cerevisiae*, nueve en *S. pombe* y catorce en humanos (Burgers *et al.*, 2001; Hübscher *et al.*, 2002; Bebenek & Kunkel, 2004; Pavlov *et al.*, 2006). Basándose en la estructura primaria de las subunidades catalíticas, las ADN polimerasas se han clasificado en diferentes familias. Los organismos eucariotas presentan cuatro familias: la familia A (Pol γ , Pol θ y Pol ν), la familia B (Pol α , Pol δ , Pol ϵ y Pol ζ), la familia X (Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT) y la familia Y (Pol η , Pol ι , Pol κ y Rev1). El suceso más relevante fue la aparición de una nueva familia de ADN polimerasas, la familia Y (Ohmori *et al.*, 2001), cuyos miembros están involucrados en la replicación a través de lesiones en el ADN. Otro hecho significativo fue el descubrimiento de Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2000) y Pol μ (Domínguez *et al.*, 2000), con las cuales se dobló el número de enzimas conocidas de la familia X de ADN polimerasas y cuyos miembros están involucrados en los procesos de reparación y viabilidad del ADN.

2. CONSERVACIÓN EVOLUTIVA DE LAS ADN POLIMERASAS DE LA FAMILIA X

Se han encontrado miembros de las ADN polimerasas de la familia X en todos los taxones monofiléticos: *Eukaria*, *Bacteria* y *Archaea*, e incluso en virus cuyo genoma es ADN (Oliveros *et al.*, 1997). En eucariotas superiores se han identificado varios miembros de ADN polimerasas de la familia X. Por el contrario, en virus, procariotas, levaduras y plantas se ha identificado un solo miembro e incluso existen especies en las que no se ha descrito ningún miembro de esta familia, como los organismos modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Burgers *et al.*, 2001). Todas ellas son polimerasas distributivas, por lo que están diseñadas para la síntesis de fragmentos cortos de ADN y no para un papel en la replicación del genoma. Esta característica hace que las ADN polimerasas de esta familia se encargen de la reparación del ADN, ya sea en el mecanismo de BER como la Pol β de mamíferos o, de una manera más general, en cualquier proceso que exija la resolución de una estructura de ADN con huecos de pocos nucleótidos.

La **figura 45** muestra las relaciones filogenéticas entre los miembros conocidos de la familia X de ADN polimerasas pertenecientes a diferentes organismos. El árbol filogenético se realizó empleando un segmento corto y muy conservado del sitio activo de polimerización, con el fin de evitar que la presencia de dominios accesorios o pequeñas inserciones o deleciones interfiriesen en el análisis. Los resultados sugieren que las distintas subfamilias que se pueden identificar dentro de la familia X (Pol β , Pol β Try., Pol λ , Pol μ y TdT) han evolucionado a partir de un ancestro común, quizá para adaptarse a los diferentes requerimientos funcionales. La evolución podría ir encaminada a la especialización de los miembros de la familia X con el fin de aumentar la eficiencia de los procesos de síntesis de ADN en los que están implicados. Por otro lado, los datos del árbol filogenético sugieren que, en eucariotas superiores, Pol λ es el miembro de la familia X que guarda mayor relación con el ancestro común del que probablemente han evolucionado todos los miembros de la familia. Un hecho que parece confirmar esta hipótesis es la extraordinaria conservación evolutiva de Pol λ , identificada en numerosos eucariotas superiores, pero también en espermatofitas (*Arabidopsis thaliana*, *Glicinia máxima*), siendo la primera ADN polimerasa de la familia

X identificada en plantas.

La existencia de una alta conservación de secuencia primaria entre las ADN polimerasas de la familia X (Oliveros *et al.*, 1997) permitió la identificación del ortólogo de Pol β en la base de datos pública de *S. pombe*/GeneDB (<http://www.genedb.org/>), que fue denominada ADN polimerasa 4 (*SpPol4*). En la presente Tesis doctoral se ha realizado la caracterización bioquímica de esta nueva ADN polimerasa eucariótica del organismo modelo *S. pombe*, *SpPol4*, y un estudio genético para intentar dilucidar en qué mecanismos se encuentra involucrada *in vivo*.

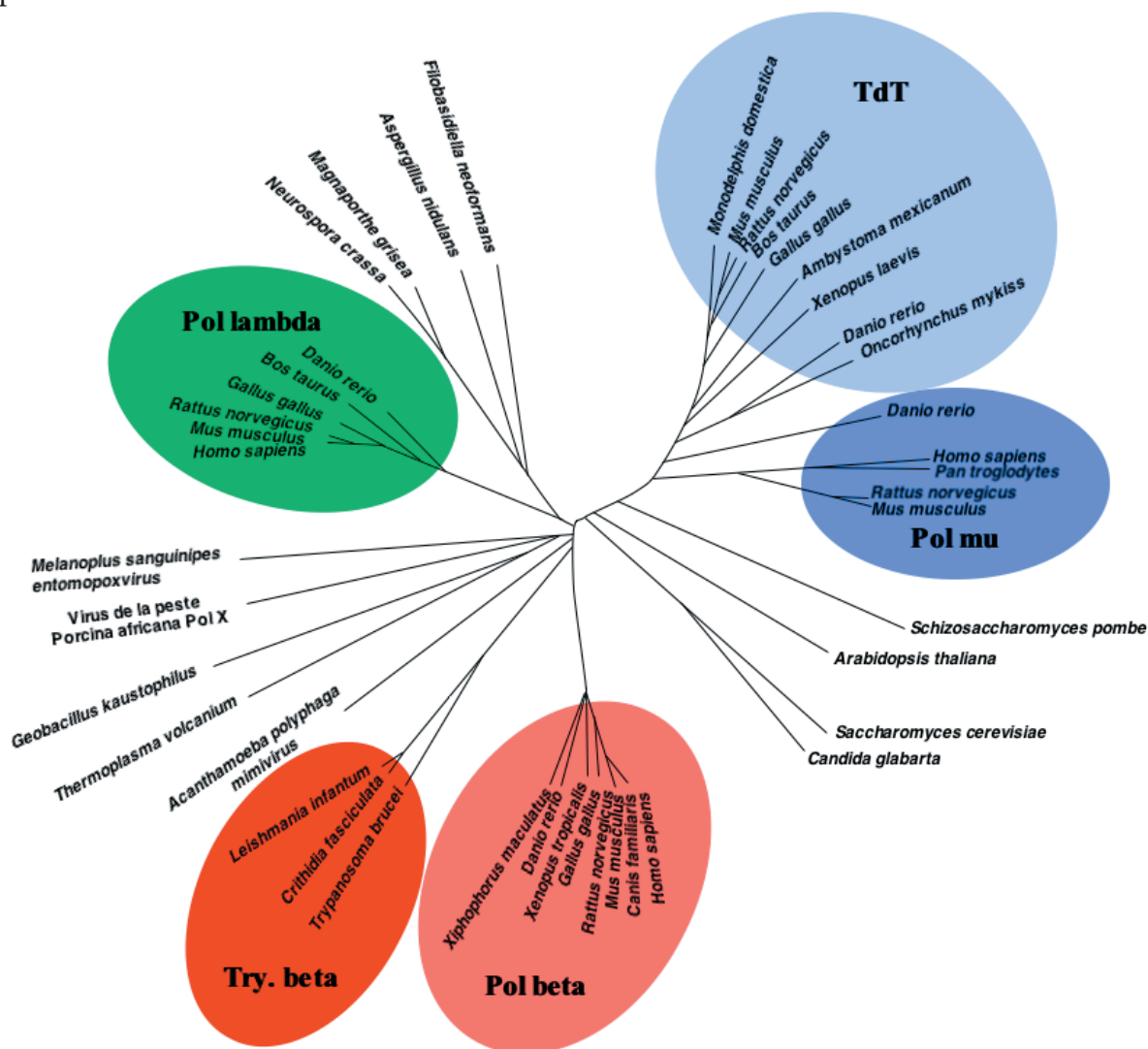


Figura 45. Relación evolutiva de los miembros de la familia X de ADN polimerasas. Árbol filogenético realizado empleando un segmento conservado perteneciente al dominio catalítico. Las diferentes ADN polimerasas se agrupan en subfamilias: Pol β Pol λ , Pol μ , TdT y Pol β de Tripanosomas. Figura tomada de García-Díaz *et al.* (2005).

3. CONSERVACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS ADN POLIMERASAS DE LA FAMILIA X

La organización modular de diferentes miembros de la familia X desde virus a eucariotas señala la existencia de una estructura básica tipo Pol β (Figura 46), compuesta por un dominio de unión al ADN de 8 kDa y un dominio de polimerización de 31 kDa formado por los subdominios *dedos*, *palma* y *pulgar* (Ruiz *et al.*, 2001; Bebenek & Kunkel, 2004) (Figura 46). La mínima versión de ADN polimerasa de la familia X se encuentra

en la PolX del virus de la peste porcina africana (VPPA), que únicamente presenta los subdominios *palma* y *pulgar* del dominio polimerasa (Oliveros *et al.*, 1997). La ausencia de dominio de 8 kDa tanto en la PolX de VPPA como en la PolX de MSEV (*Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus) puede reflejar la existencia de otras proteínas codificadas por el genoma viral que aporten las propiedades catalíticas y/o de unión a ADN que este dominio ejerce en los miembros de la familia X de otros organismos. A pesar del reducido tamaño de la PolX de VPPA, posee una segunda actividad enzimática asociada, la actividad AP liasa, que indica un posible papel en la ruta de BER viral (García-Escudero *et al.*, 2003).

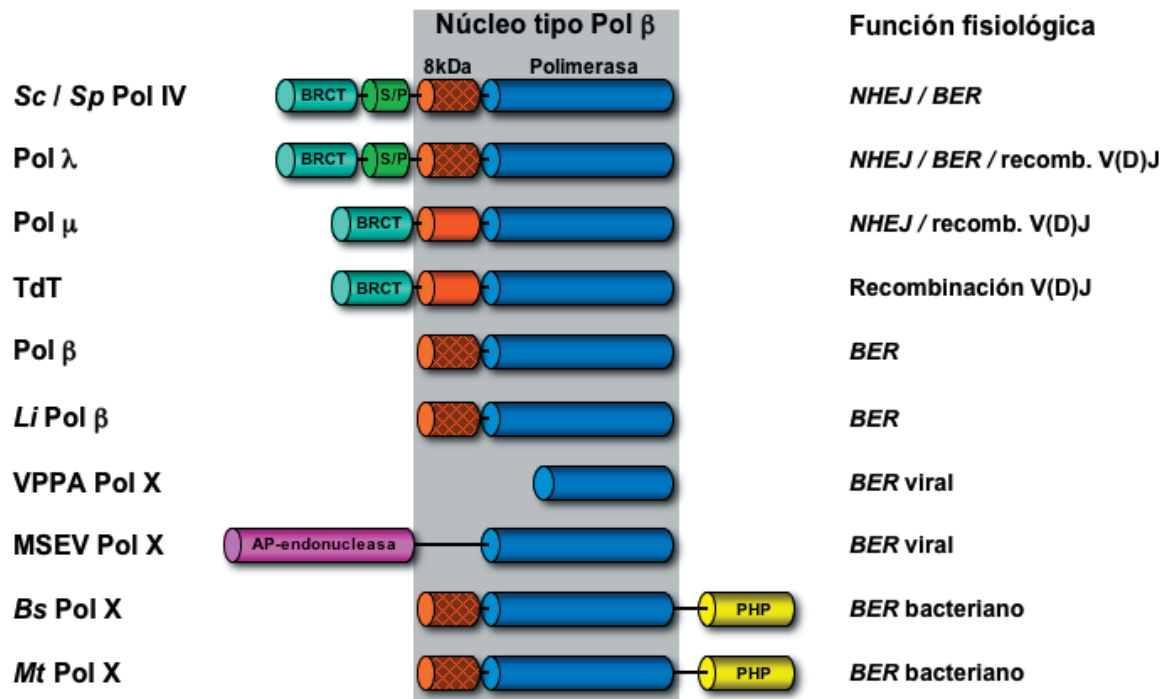


Figura 46. Organización modular de los miembros de la familia X de ADN polimerasas. Representación esquemática de los dominios presentes en miembros de la familia desde virus a eucariotas superiores, así como la función propuesta para cada uno de dichos miembros. Los dominios de 8 kDa carentes de actividad dRP liasa se representan en color liso, mientras que los que poseen dicha actividad se representan rayados. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Li: *Leishmania infantum*; VPPA: virus de la peste porcina africana; MSEV: *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus; Bs: *Bacillus subtilis*; Mt: *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

La divergencia evolutiva de los miembros de la familia X ha ocurrido en gran parte por la adquisición de dominios adicionales con diferentes propiedades reguladoras y/o actividades enzimáticas. De esta forma, la PolX de MSEV posee asociada en el mismo polipéptido una AP endonucleasa (Figura 46), formando una pareja idónea para participar en la ruta de BER viral. Miembros de la familia X de eubacterias (*Bacillus subtilis*) y arqueobacterias (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) muestran la fusión independiente de su núcleo conservado tipo Polβ a un dominio fosfodiesterasa (PHP, Figura 46), con el fin de tener en un mismo polipéptido las actividades ADN polimerasa y nucleasa, lo que podría constituir para la célula una gran ventaja funcional de cara a realizar procesos de reparación por la ruta de BER.

En eucariotas existen miembros de esta familia desde protozoos (*Leishmania infantum*) hasta mamíferos (Figura 46). Sin embargo, existen grandes diferencias en cuanto a los dominios accesorios que presentan y que guardan una relación muy estrecha con su función fisiológica.

La presencia de dominios de interacción BRCT en el extremo N-terminal en Pol λ , Pol μ y TdT, está relacionada con el papel que juega este dominio en procesos como la recombinación V(D)J y la reparación por NHEJ. Es posible que sutiles diferencias en la secuencia aminoacídica de los dominios BRCT de estas tres ADN polimerasas tengan gran importancia a la hora de regular el acceso de cada ADN polimerasa a un determinado sustrato o proteína de la ruta. En cambio, Pol β habría evolucionado perdiendo dominios accesorios, consiguiendo así una especialización crucial para la célula, ya que protege frente a la gran cantidad de daño oxidativo presente como consecuencia del metabolismo aerobio. La única conservación del dominio polimerasa y del dominio de 8 kDa (**Figura 46 y 47**), donde reside la actividad dRP liasa, resulta idónea para la participación en la ruta BER.

Contrariamente a mamíferos, las levaduras presentan un único miembro de ADN polimerasa de la familia X, denominada Pol4. Tanto la Pol4 de *S. cerevisiae* como de *S. pombe* posee en su extremo N-terminal dos dominios adicionales: un dominio de regulación Ser/Pro (S/P) y un dominio de interacción BRCT (**Figura 46**). Además, ambas presentan la actividad dRP liasa asociada a su dominio de 8 kDa lo que sugiere un papel de las Pol4 de levaduras en procesos de reparación por BER (Bebenek *et al.*, 2005). Al igual que en eucariotas superiores, el dominio BRCT de ScPol4 permite la interacción con los factores implicados en la ruta NHEJ y la participación de esta ADN polimerasa en los eventos de síntesis de ADN producidos durante la reparación de una rotura de doble cadena (Tseng & Tomkinson, 2002; Tseng & Tomkinson, 2004).

A pesar de que ambas Pol4 presentan una organización estructural común presentan diferencias en cuanto a la similitud de secuencia con sus homólogos humanas. Mientras ScPol4 es más parecida a Pol λ en cuanto a la composición de la estructura básica tipo Pol β , 25% de identidad (Bebenek *et al.*, 2005), SpPol4 está más cerca evolutivamente de Pol μ (27% de identidad) seguida de Pol λ (24% de identidad). Basándonos en la similitud de secuencia se puede especular que SpPol4 es el ortólogo en levaduras de la Pol μ humana, mientras que ScPol4 sería el ortólogo de la Pol λ humana (**Figura 47**).

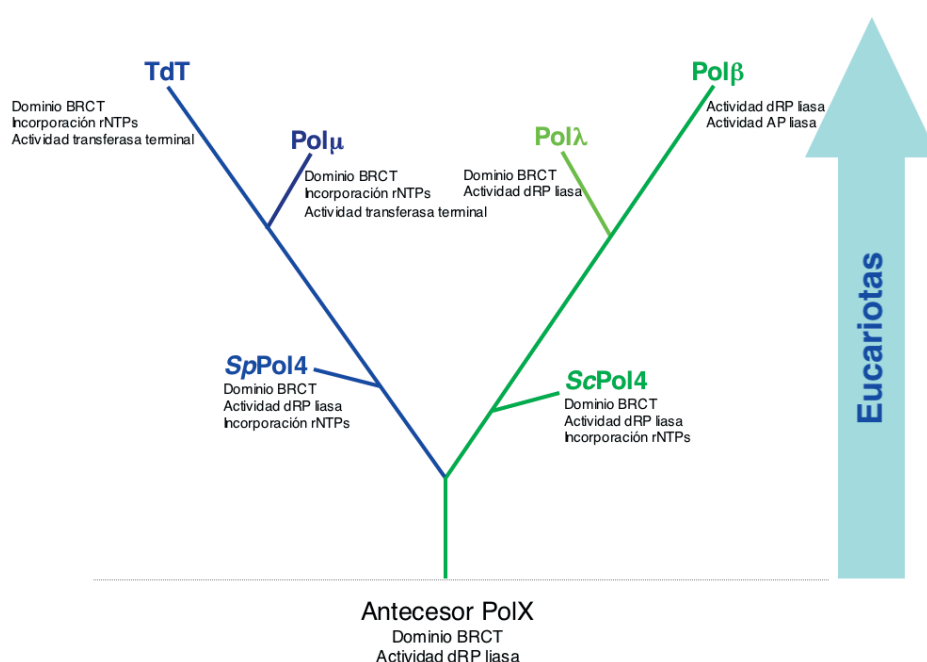


Figura 47. Evolución de las ADN polimerasas de la familia X

En resumen, los miembros de la familia X de ADN polimerasas se han especializado en diferentes procesos de síntesis de ADN asociados a reparación. Tales procesos son básicamente tres: la reparación por escisión de base (BER), llevada a cabo fundamentalmente por Pol β , aunque también Pol λ parece tener un papel relevante en situaciones concretas; la unión de extremos no homólogos (NHEJ), en la que según el tipo de sustrato generado han de participar tanto Pol λ , como Pol μ y TdT; y la recombinación V(D)J, en la que participan Pol λ , Pol μ y TdT ejerciendo diversos papeles. Sutiles diferencias en las propiedades bioquímicas de los miembros de la familia X podrían resultar cruciales a la hora de llevar a cabo los procesos en los que participan de manera conjunta. Los miembros de esta familia han evolucionado para llevar a cabo tareas concretas dentro de procesos de síntesis en los que participan otros miembros de la familia, alcanzando de esta forma un alto grado de especialización que ha tenido como consecuencia un alto grado de eficiencia y posibles soluciones alternativas (cierta redundancia) en los procesos en los que toman parte (Figura 47).

4. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE SpPol4

En esta Tesis doctoral se ha realizado una caracterización bioquímica preliminar de la ADN polimerasa 4 de *S. pombe*, SpPol4. Como se resume en la tabla 10, SpPol4 es una ADN polimerasa dependiente de molde que presenta una baja procesividad para la extensión de un sustrato molde/cebador comportándose como una polimerasa distributiva. Por lo tanto, carece de la capacidad de polimerizar sobre una cadena sencilla de ADN. Estas propiedades las comparte con todos los miembros de ADN polimerasas de la familia X, excepto con TdT (Nick McElhinny & Ramsden, 2004). Además, como para el resto de miembros de la familia X su actividad se ve estimulada por la presencia de iones Mn²⁺. Los ensayos EMSA indican que SpPol4 tiene preferencia por sustratos de ADN que presenten un hueco de pocos nucleótidos con un grupo fosfato en posición 5', mejorando así la polimerización de estos sustratos frente a los que contienen en la misma posición un grupo hidroxilo. Esta característica la comparte con Pol β , Pol λ (Braithwaite *et al.*, 2005) y Pol μ , pero no con ScPol4 (Bebenek *et al.*, 2005). Se ha postulado que esta peculiaridad es esencial para el papel de Pol β en la reparación del ADN (Singhal & Wilson, 1993). Este hecho sugiere la relación de SpPol4 con la reparación de pequeños huecos en el ADN.

4.1. Fidelidad de síntesis

Las ADN polimerasas de la familia X no se caracterizan por una elevada fidelidad de síntesis (Domínguez *et al.*, 2000), debido, en parte a que carecen de una actividad exonucleasa 3'→5' que permita corregir los errores cometidos. Aún así, Pol β realiza la síntesis de ADN de modo relativamente fiel, con una frecuencia de error de 10⁻³-10⁻⁴ (Osheroff *et al.*, 1999). Los datos obtenidos para SpPol4 nos indican que carece de actividad exonucleasa 3'→5' y la síntesis de ADN realizada es dirigida por molde siguiendo las reglas de apareamiento de Watson-Crick. Según los resultados, SpPol4 prefiere insertar nucleótidos de purinas en el siguiente orden: dG>>dA>dT>dC, lo cual difiere del comportamiento de otras ADN polimerasas de la familia X (Pol β , Pol λ y Pol μ). La mayor parte de los daños en el ADN que recibe una célula son hidrólisis, alquilaciones, oxidaciones y desaminaciones de las bases nitrogenadas, los cuales son reparados mayoritariamente por BER. Se sabe que, al menos en células de mamíferos, la pérdida de purinas es más frecuente, unas 20 veces, que la pérdida de pirimidinas. Además, las purinas se alquilan muy frecuentemente y la guanina es la base más

propensa a la oxidación (8-oxoG) y junto con la adenina, se pueden formar estructuras llamadas formamidopirimidinas (FaPyG y FaPyA) (Lindahl & Wood, 1999; Nilsen & Krokan, 2001; Neeley & Essigmann, 2006). Por esta razón, se puede especular que esta preferencia de *SpPol4* por las purinas sea una adaptación en el papel de reparación de las purinas por mecanismos de BER.

SpPol4 es una enzima muy versátil, ya que es capaz de incorporar rNTPs en el extremo 3' hidroxilo del cebador de ADN, incluso con la misma eficiencia con la que inserta dNTPs. Este comportamiento es raro para una enzima sintetizadora de ADN, ya que la mayoría de las ADN polimerasas discriminan muy eficientemente la naturaleza del azúcar del nucleótido, favoreciendo enormemente la inserción de dNTPs en el ADN. De hecho, existen pocas ADN polimerasas conocidas que presenten la habilidad de insertar rNTPs. Esta capacidad se ha descrito para otros miembros de la familia X: TdT (Boulé et al., 2001), Polμ (Nick McElhinny & Ramsden, 2003; Ruiz et al., 2003) y ScPol4 (Bebenek et al., 2005). Sin embargo, miembros de esta misma familia, como Polβ o Polλ no parecen poseer esta capacidad. En general, en las ADN polimerasas replicativas, la discriminación del azúcar parece depender de un único aminoácido del sitio activo que actúa como barrera estérica bloqueando el grupo 2' hidroxilo del nucleótido entrante (Joyce, 1997). La capacidad para insertar rNTPs de la Polμ humana depende mayoritariamente del residuo Gly433 (Ruiz et al., 2003). El pequeño tamaño de la cadena lateral de la Gly433 de Polμ es esencial para que esta capacidad se mantenga. Así, en *SpPol4* cuando la glicina equivalente a la Gly433 de la Polμ humana, Gly434 es sustituida por el residuo que tiene Polβ con una cadena lateral voluminosa (Tyr) se favorece la discriminación entre ribo- y desoxirribonucleótidos por *SpPol4*. Estos resultados sugieren que el tamaño de la cadena lateral presente en esta posición regula la discriminación del azúcar por las ADN polimerasas de la familia X.

La elevada eficiencia de inserción de rNTPs por *SpPol4* puede ser relevante, teniendo en cuenta que la incorporación de estos en el ADN podría resultar mutagénica de no ser reparados. El significado biológico de esta capacidad de polimerizar indiscriminadamente dNTPs o rNTPs es una incógnita hasta el momento. Se ha propuesto que Polμ podría haber adquirido esta capacidad de polimerizar rNTPs para ser más efectiva en los momentos en los que las reservas nucleares de dNTPs son bajas, pues las reservas de rNTPs se mantienen elevadas durante todo el ciclo celular e, incluso, en células que no se dividen (Nick McElhinny & Ramsden, 2003). Los dNTPs sólo muestran concentraciones elevadas durante la fase S, mientras que existe una disponibilidad constante de rNTPs durante todas las fases del ciclo celular (Bjursell & Skoog, 1980; McCormick et al., 1983; Traut, 1994). *In vivo*, se ha descrito que existe una concentración de rNTPs 10 veces mayor que dNTPs (Meuth, 1984). La enzima ribonucleótido reductasa se encarga de sintetizar dNTPs a partir de rNTPs, siendo la hidroxiaurea (HU) un inhibidor de esta enzima. Altos niveles de HU provocan una parada de las horquillas de replicación, pudiéndose explicar este efecto de dos maneras. En primer lugar, puede deberse a defectos durante la replicación, como puede ser un mal procesamiento de los fragmentos de Okazaki. En segundo lugar y con la misma probabilidad, puede suceder que la disminución de los dNTPs promuevan un aumento en la incorporación de rNTPs en el ADN, no pudiendo ser eficientemente eliminados. Los resultados *in vivo* obtenidos en esta Tesis doctoral indican que *S. pombe* es especialmente sensible al daño inducido por HU y que la acción de *SpPol4* está contribuyendo a esta sensibilidad. Por un lado, *SpPol4* podría ser la principal responsable de insertar rNTPs en el ADN. Por otro lado, en humanos y *S. cerevisiae* se ha descrito un mecanismo de reparación de los rNTPs incorporados en el ADN similar

al BER, en el cual participan ARNasa H y FEN1/Rad27 (Rydberg & Game, 2002). En presencia de altas concentraciones de HU, las ADN polimerasas replicativas se verían forzadas a incorporar rNTPs en el ADN. Entonces, *SpPol4* podría ser reclutada para intentar reparar el daño que se está produciendo en la horquilla, pero sin llegar a repararlo ya que se vería favorecida la incorporación de rNTPs. De ambas formas, *SpPol4* estaría interfiriendo en la progresión de la horquilla de replicación.

Por otro lado, la capacidad de insertar rNTPs podría ser beneficioso con respecto al posible papel de *SpPol4* en la vía de reparación de roturas de cadena doble en el ADN mediante NHEJ (ver más adelante). La contribución de esta capacidad de inserción de rNTPs no resulta obvia, aunque se ha especulado que la presencia de rNTPs podría estabilizar la conectividad de extremos mediados por microhomologías.

4.2. Actividad dRP liasa

Además de su actividad de polimerización, Pol β posee dos actividades nucleolíticas relacionadas, denominadas dRP liasa y AP liasa (Prasad *et al.*, 1998a). Se trata de dos actividades capaces de actuar sobre sitios abásicos en el ADN, catalizando la rotura del enlace fosfodiéster que existe entre el carbono 3' de la ribosa que ha perdido la base y el carbono 5' de la ribosa del siguiente nucleótido. Ambas actividades enzimáticas difieren en el sustrato que utilizan, ya que mientras que la actividad AP liasa utiliza sitios abásicos íntegros, la dRP liasa requiere la rotura previa del enlace fosfodiéster en posición 5' del sitio abásico, eliminando de esta forma residuos 5'dRP. Además, las dos actividades difieren en su eficiencia, siendo la actividad dRP liasa unas 100 veces más eficiente que su actividad AP liasa (Prasad *et al.*, 1998a). También se diferencian en su significado biológico, mientras que la actividad dRP liasa es esencial para el mecanismo de BER de trecho corto, el de la AP liasa es incierto (Sobol *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos muestran que al igual que Pol β , *SpPol4* presenta actividad dRP liasa pero, por el contrario, carece de actividad AP liasa. En Pol β , el dominio de 8 kDa contiene el centro activo de la actividad dRP liasa. Esta actividad tiene lugar gracias a un mecanismo de β -eliminación a través de un intermediario en forma de base de Schiff y de manera independiente de metal (Prasad *et al.*, 1998b). El hecho de que sea posible atrapar por reducción un complejo covalente ADN-proteína sugiere que, de igual modo, la reacción catalizada por *SpPol4* transcurre por un mecanismo que implica la formación de una base de Schiff. Además, esto se confirma por la incapacidad de *SpPol4* de catalizar la eliminación de un grupo dRP reducido que, por tanto no es susceptible a la β -eliminación.

De acuerdo con los resultados obtenidos que demuestran que la reacción catalizada por *SpPol4* transcurre por el mismo mecanismo que la reacción catalizada por Pol β y Pol λ , se decidió tratar de identificar el residuo o residuos responsables del ataque nucleofílico en la *SpPol4*. El residuo aminoacídico crítico para la actividad dRP liasa se ha identificado tanto en la Pol β (Lys72) como en la Pol λ (Lys312) (Prasad *et al.*, 1998b; García-Díaz *et al.*, 2001). Este residuo corresponde a una lisina catalítica que actuaría como base de Schiff durante la eliminación del residuo dRP. Pol μ y *SpPol4* carecen de esta lisina catalítica pero, mientras Pol μ carece de actividad dRP liasa, *SpPol4* posee esta actividad. Este hecho nos indica que otra lisina cercana actúa en el mecanismo de β -eliminación. Se han propuesto otros residuos que facilitan la eliminación del residuo dRP en Pol β (Lys35, Tyr39 y Lys68), los cuales están conservados en *SpPol4* (Arg201, Tyr205 y Lys234 respectivamente). Por lo tanto, se trató de identificar el

residuo o residuos candidatos para ser el nucleófilo empleado por *SpPol4* para la base de Schiff: los residuos Arg201 y Lys234. El análisis del mutante *SpPol4*^{R201AK234A} permitió comprobar su importancia para la actividad dRP liasa, aunque no es esencial, ya que sigue existiendo una actividad residual en el mutante (menos del 10%). Esto puede ser debido a la flexibilidad de la reacción que, en determinadas condiciones, es espontánea en ausencia de catalizador y que en ausencia del nucleófilo preferido podría emplear como nucleófilo otra lisina circundante, aunque con menor eficiencia. Este efecto también se ha observado en Pol β , la cual para eliminar por completo su actividad dRP liasa catalítica es necesario sustituir, además de la Lys72, la Lys35 y la Lys68 (Prasad *et al.*, 1998a).

Por otro lado, la ausencia de la actividad AP liasa en *SpPol4* es un resultado sorprendente, ya que en la Pol β se ha asumido que tanto la actividad AP liasa como la dRP liasa dependen de los mismos residuos y que la diferencia en la eficiencia catalítica de ambas actividades responde sencillamente a una menos accesibilidad del sustrato abásico frente al residuo dRP. El hecho de que tanto *SpPol4* como Pol λ presenten actividad dRP liasa careciendo de actividad AP liasa sugiere que ambas actividades no requieren los mismos residuos bien para la catálisis, bien para la unión del sustrato o, incluso, que ambas actividades estén situadas en distintos centros activos.

En conclusión, la caracterización bioquímica de *SpPol4* muestra que comparte propiedades bioquímicas con diferentes miembros de la super-familia PolX; de esta manera se puede considerar como una enzima única (Tabla 11). Las PolXs de mamíferos se han especializado en BER (Pol β), NHEJ acoplado a BER (Pol λ), NHEJ mediado por microhomología (Pol μ) o recombinación V(D)J (TdT). Sin embargo, el hecho de que las levaduras posean una única polimerasa de esta familia sugiere que han evolucionado a partir de un antecesor común de la familia, lo que apoya la idea de que las polimerasas de levaduras tengan un papel menos especializado y multipotencial en diferentes mecanismos de reparación del ADN, ya que combinan las distintas propiedades bioquímicas de sus homólogos en mamíferos.

ADN polimerasa	Estimulación por 5' fosfato	Inserción de rNTP	Actividad transferasa terminal	Actividad dRP liasa	Actividad AP liasa
<i>SpPol4</i>	Si	Si	No	Si	No
<i>ScPol4</i>	No	Si	¿?	Si	¿?
Polλ	Si	No	Débil	Si	No
Polμ	Si	Si	Si	No	No
Polβ	Si	No	No	Si	Si

Tabla 11. Comparación de las propiedades de *SpPol4* con otros miembros de la familia X

5. POSIBLES FUNCIONES DE *SpPOL4*

Los datos obtenidos de la caracterización bioquímica de *SpPol4* junto con los datos aportados de otros miembros de la familia X, sugieren la participación de esta ADN polimerasa en diferentes procesos celulares los cuales se discuten a continuación.

5.1. *SpPol4* y la reparación por escisión de base (BER)

En células de mamífero, se ha demostrado que Pol β es esencial para la ruta BER de trecho corto tanto en el paso de síntesis (Sobol *et al.*, 1996), como en el paso de eliminación del residuo dRP (Sobol *et al.*, 2000; Podlutzky *et al.*, 2001b). Otros estudios han demostrado que la deficiencia en la actividad dRP liasa de Pol β , y no en su actividad polimerasa, aumenta extraordinariamente la sensibilidad a la acción de agentes alquilantes de fibroblastos embrionarios deficientes en Pol β (Sobol *et al.*, 2000). Además, se ha sugerido que Pol β participa minoritariamente en la ruta BER de trecho largo (Dianov *et al.*, 1999; Horton *et al.*, 2000; Podlutzky *et al.*, 2001a; Prasad *et al.*, 2001), y se ha demostrado *in vitro* una estimulación de Pol β por FEN-1 (homólogo de Rad27 en *S. cerevisiae* y Rad2 en *S. pombe*), enzima esencial para esta variante de BER (Prasad *et al.*, 2000). En cambio, en *S. cerevisiae* el papel de ScPol4 en la reparación por BER no está del todo claro, ya que tanto el mutante haploide *pol4*, como el mutante diploide *pol4/pol4*, presenta una modesta sensibilidad a MMS (Sterling & Sweasy, 2006). Teniendo en cuenta los datos publicados hasta el momento, a diferencia de lo que sucede en mamíferos, en *S. pombe* el mecanismo de reparación por BER en cualquiera de sus versiones, BER de trecho corto y BER de trecho largo, no requiere de la participación de una actividad dRP liasa (Alseth *et al.*, 2004; Alseth *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos muestran que *SpPol4* es capaz de sustituir a Pol β y Pol λ en un ensayo de reconstitución *in vitro* para la reparación de la base uracilo por BER de trecho corto (Nicholl *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1998; García-Díaz *et al.*, 2001). *SpPol4* está capacitada para coordinar los pasos de reparación, relleno del hueco y eliminación del residuo dRP antes de la acción de la ligasa. Este dato es compatible con un papel *in vivo* de *SpPol4* en el mecanismo de BER en *S. pombe*.

Los estudios genéticos realizados apoyan un papel auxiliar de *SpPol4*, basado en su actividad dRP liasa, en el mecanismo de BER de *S. pombe* en respuesta a las lesiones producidas por el agente alquilante MMS y el agente oxidativo KBrO₃. Los datos obtenidos respaldan la participación de *SpPol4* en una nueva versión de BER en *S. pombe* (Figura 48). Esta ruta sería equivalente al mecanismo de reparación BER de trecho corto utilizado en mamíferos, el cual es iniciado por la acción de Apn2 que realiza el corte en posición 5' del sitio abásico generando un residuo 5'dRP (Dianov *et al.*, 2003; Slupphaug *et al.*, 2003) y en el que la actividad dRP liasa de Pol β es crucial para eliminar el daño seguido del paso de síntesis de ADN. Como se muestra en la figura 48, gracias a la actividad dRP liasa intrínseca de *SpPol4*, ésta podría actuar detrás de Apn2, eliminando el residuo 5'dRP y rellenando el hueco generado, que a continuación sería sellado por una ADN ligasa. Además, aproximadamente el 40% de la actividad dRP liasa de extractos celulares totales de *S. pombe* es aportada por *SpPol4*. Este dato muestra la importancia *in vivo* de la actividad dRP liasa de *SpPol4* en *S. pombe* asociada o no a la ruta de reparación BER.

De acuerdo a las características enzimáticas descritas, que muestran una preferencia por sustratos de ADN con pequeños huecos, *SpPol4* podría actuar como la polimerasa

encargada de rellenar el hueco generado tanto por la acción de Nth1 y Apn2 en el BER de trecho corto, como por la acción de Apn2 y Rad2 en el BER de trecho largo. De este modo, ensayos *in vitro* realizados demuestran que SpPol4 podría participar en la ruta de BER de trecho largo gracias a su capacidad de insertar nucleótidos de forma acoplada a un desplazamiento de banda. En *S. cerevisiae* se ha demostrado una interacción física y funcional de ScPol4 con Rad27, homólogo de FEN1 en mamíferos y de Rad2 en *S. pombe* (Tseng & Tomkinson, 2004). De forma análoga, en *S. pombe* podría darse una interacción física y funcional entre SpPol4 y Rad2 que favoreciera el desplazamiento de banda y la inserción de nucleótidos en el BER de trecho largo.

Diferentes estudios han demostrado que el mecanismo de BER junto con el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (NER) y la recombinación homóloga (RH) participan en la reparación del daño inducido por MMS (Memisoglu & Samson, 2000a; Osman *et al.*, 2003). Los resultados muestran que la presencia de SpPol4 podría interferir, en ausencia de Apn2, en el procesamiento del producto tóxico generado por Nth1 (3' dRP). De este modo, la ausencia de SpPol4 favorecería que el daño fuese reparado por HR o NER, o incluso la reparación podría tener lugar por NHEJ debido al posible papel de SpPol4 en dicho mecanismo. Alternativa o adicionalmente, SpPol4 podría participar en mecanismos de reparación cuyo resultado sea mutagénico, ya que los resultados apuntan a que SpPol4 participa de forma directa en la capacidad de mutagénesis adaptativa de *S. pombe*, debido a que su ausencia contribuye a una mayor estabilidad genómica.

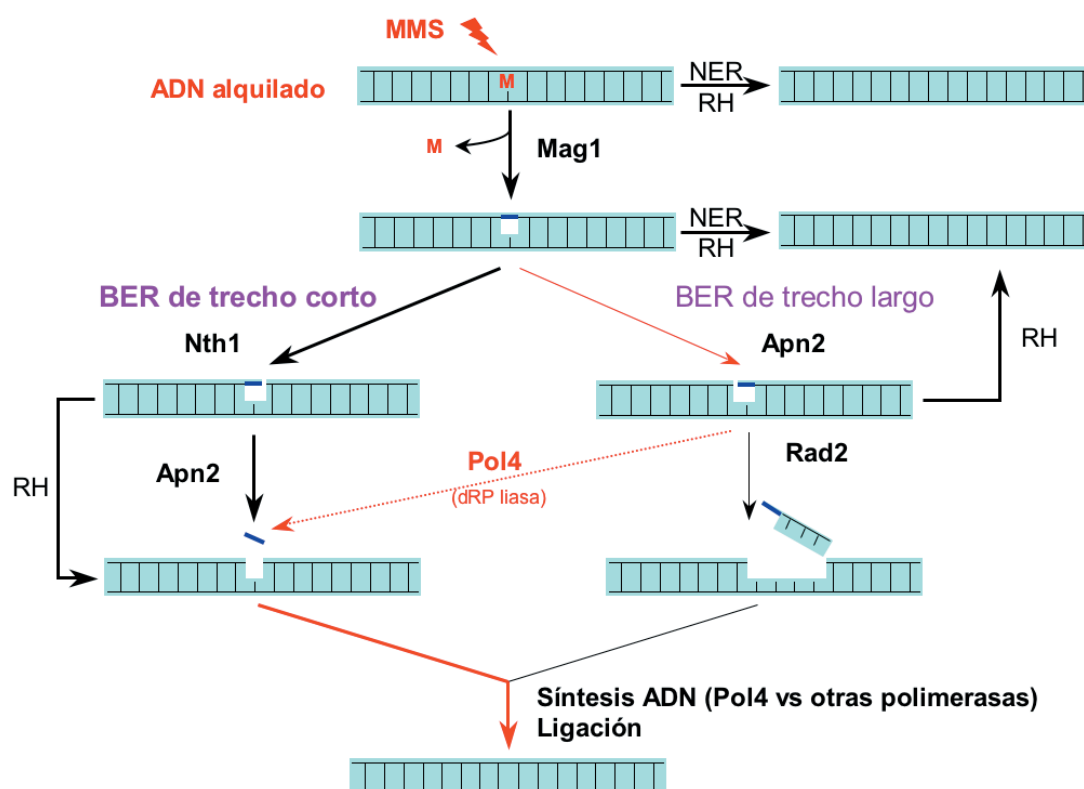


Figura 48. Modelo de reparación del daño en el ADN inducido por MMS en *S. pombe*. Las abreviaturas incluidas en la figura hacen referencia a los siguientes términos: MMS, metil metanosulfonato; M, base metilada; BER, reparación por escisión de base; NER, reparación por escisión de nucleótido; RH, recombinación homóloga. Figura adaptada de Alseth *et al.*, 2005.

5.2. *SpPol4* y la reparación de roturas de doble cadena de ADN

Una de las múltiples consecuencias del metabolismo del ADN y de la acción de determinados agentes exógenos, como la radiación ionizante, es la generación de roturas de doble cadena en el ADN (DSB). Este tipo de roturas son especialmente dañinas para la célula, pudiendo derivar en mutaciones, tumorigénesis e incluso la muerte celular si no son reparadas correctamente. Las células eucariotas presentan dos mecanismos de reparación: la recombinación homóloga (HR) y la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Mientras que en células de mamíferos el mecanismo predominante para la reparación de DSB es el mecanismo de NHEJ, en levaduras es el mecanismo de HR el que se encarga mayoritariamente de la reparación de DSB.

Actualmente, las ADN polimerasas de la familia X se han visto involucradas en el mecanismo de reparación de DSB por NHEJ. En *S. cerevisiae*, *ScPol4* es requerida para el NHEJ de extremos incompatibles, en el cual es necesaria para la síntesis en los huecos generados (Wilson & Lieber, 1999; Daley *et al.*, 2005; Pardo *et al.*, 2006). Asimismo, se ha demostrado una interacción física y funcional a través del dominio BRCT de *ScPol4* con el complejo Lif1-Dnl4 (homólogo del complejo XRCC4-Ligasa IV de mamíferos) y Rad27 (homólogo de FEN-1 en mamíferos) (Tseng & Tomkinson, 2002; Tseng & Tomkinson, 2004). Datos *in vitro* demuestran una asociación, mediante el dominio BRCT de *Polμ*, con Ku y el complejo XRCC4-Ligasa IV (Mahajan *et al.*, 2002) y una interacción similar entre *Polλ* y el complejo XRCC4-Ligasa IV (Fan & Wu, 2004). Además, diferentes estudios concluyen que *Polμ* podría realizar una polimerización independiente de molde para promover la aparición de microhomologías de secuencia necesarias para el alineamiento durante NHEJ (Ma *et al.*, 2004; Juárez *et al.*, 2006).

Algunas de las características bioquímicas de *SpPol4*, como su baja procesividad, su preferencia por moléculas de ADN con pequeños huecos y su afinidad por moléculas 3' protuberantes, apoyan indirectamente su posible participación en el proceso de NHEJ. Sin embargo, la característica principal de *SpPol4* que sugiere un papel en NHEJ es su capacidad para unir moléculas de ADN generando o aceptando errores transitorios de apareamiento entre cebador y molde, y utilizar estas moléculas como sustratos de polimerización. Este comportamiento refleja la flexibilidad de su sitio activo para acomodar las distorsiones en el dúplex de ADN provocadas por estos realineamientos, teniendo una importante consecuencia: la posibilidad de promover una búsqueda de microhomologías de secuencia entre el extremo del cebador y la cadena de ADN molde hasta alcanzar una situación suficientemente estable que permita la polimerización.

Los resultados recogidos en esta Tesis doctoral no apoyan claramente un papel *in vivo* de *SpPol4* en el mecanismo de reparación de NHEJ, pero si apoyan un papel en la reparación de DSB en *S. pombe*. Los datos obtenidos en cultivos asincrónicos carentes de HR concluyen que *SpPol4* estaría participando en el mecanismo de reparación de DSB, presumiblemente a través de NHEJ. En cambio, al realizar el estudio en células sincronizadas en la fase G1 del ciclo celular por distintas aproximaciones, se concluye que *SpPol4* participa en la reparación de DSB en la fase G1 del ciclo celular, pero a través de un mecanismo diferente a NHEJ, independiente de Ku70. Esta vía alternativa podría ser el mecanismo de unión de extremos mediante microhomología (MMEJ). De hecho, recientes estudios han relacionado a la *Pol4* de levadura con el mecanismo de MMEJ. En *S. pombe*, se ha demostrado que la reparación por MMEJ es dependiente de *SpPol4* (Decottignies, 2007) y en *S. cerevisiae*, *ScPol4* es esencial para el relleno de

huecos generados durante MMEJ (Lee & Lee, 2007).

5.3. *SpPol4* y los mecanismos de tolerancia al daño

La mayor parte de las lesiones que se producen en el ADN son eliminadas por los mecanismos de reparación BER y NER, sin embargo muchas lesiones se escapan de la maquinaria de reparación pudiendo bloquear los procesos de replicación y transcripción. Entonces, queda la opción de que este tipo de daño pudiera ser aceptado de forma transitoria para que la replicación pueda continuar, pues de no ser así la célula podría comprometer su viabilidad. En eucariotas, las ADN polimerasas de la familia Y y Pol ζ , perteneciente a la familia B, se encargan de la síntesis a través de lesiones (TLS) (Prakash *et al.*, 2005). Cada una de estas ADN polimerasas parece especializada para actuar frente a un tipo de daño en el ADN concreto y cada una lleva a cabo la TLS de una manera diferente; por ejemplo, Pol η es capaz de realizar una TLS de manera fiel cuando se encuentra un dímero de timinas en el molde, polimerizando los correspondientes residuos de dAMP al cebador. No obstante, otras ADN polimerasas se han implicado en mecanismos de TLS frente a diversos tipos de daño en el ADN molde, como la ADN polimerasa de la familia X Pol λ . El posible papel de Pol λ en este proceso está apoyado por la interacción específica con PCNA tanto *in vitro* como *in vivo* (Maga *et al.*, 2002; Shimazaki *et al.*, 2002; Maga *et al.*, 2004; Shimazaki *et al.*, 2005), así como por su capacidad de extensión de extremos desapareados y de síntesis frente y a partir de bases modificadas en la cadena molde, ambas características de vital importancia en este proceso (Picher & Blanco, 2007).

La replicación a través de lesiones suele requerir la acción de dos ADN polimerasas, una que se encargue de la inserción del nucleótido frente a la lesión y otra que realice la subsiguiente reacción de extensión. Los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral plantean una colaboración entre Eso1 (*SpPol* η) y *SpPol4* en el proceso de TLS de la lesión 8-oxoG de manera libre de error, en la que Eso1 insertaría frente a la lesión 8-oxoG el nucleótido correcto y *SpPol4* se encargaría de la extensión del par correcto 8-oxoG·dC. Este resultado contrasta con los datos obtenidos para la ADN polimerasa Pol η de *S. cerevisiae*, la cual combina una gran fidelidad y una gran eficiencia catalítica en la síntesis frente a 8-oxoG de manera libre de error (Haracska *et al.*, 2000). Mientras que la Pol η humana presenta un comportamiento diferente; muestra un fenotipo parecido al descrito para *SpPol4* y Pol λ , ya que inserta con similar eficiencia dA y dC frente a 8-oxoG (Zhang *et al.*, 2000), siendo Pol λ la ADN polimerasa que presenta una mayor eficiencia en la extensión del par correcto (Picher & Blanco 2007).

Los datos *in vivo* aportados en esta Tesis doctoral muestran que los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena, HR y NHEJ, tienen el mismo peso a la hora de reparar el daño generado por el bromato potásico: DSB asociadas al daño oxidativo 8-oxoG. Sorprendentemente, este hecho es exclusivo de este tipo de daño. El que *SpPol4* posea actividad dRP liasa sugiere que quizá pueda participar en la reparación de extremos que presenten residuos dRP como consecuencia colateral del agente que generó la rotura de doble cadena, aumentando aún más la versatilidad del mecanismo de reparación. Asimismo, la capacidad de inserción frente a bases modificadas y de extensión desde pares cuya base molde se encuentra modificada también es una propiedad útil en el proceso de NHEJ, ya que es factible que el agente que provoque la rotura también cause modificaciones químicas en las bases próximas a la rotura.

CONCLUSIONES

1. Mediante búsquedas de homología en bases de datos de secuencias se ha identificado un nuevo gen que codifica una nueva ADN polimerasa de la familia X en *S. pombe*, denominada *SpPol4*.
2. *SpPol4* comparte una organización modular común a otros miembros de la familia X: una estructura básica tipo Pol β , un dominio BRCT en el extremo N-terminal y una región rica en serinas y prolina entre ambos.
3. *SpPol4* es una enzima única que combina las distintas propiedades bioquímicas de sus homólogos en mamíferos.
4. Al igual que Pol β y Pol λ , *SpPol4* presenta actividad dRP liasa que, junto a su capacidad de polimerización, le permite coordinar los pasos de reparación de un uracilo en una reconstitución *in vitro* de la reparación por el mecanismo de BER.
5. Nuestros estudios *in vivo* han demostrado que *SpPol4* realiza una función auxiliar en el mecanismo de BER en *S. pombe*, siguiendo una ruta similar a la utilizada en células de mamíferos.
6. *SpPol4*, al igual que Pol μ y TdT, es capaz de utilizar ribonucleótidos como sustratos nucleotídicos durante la polimerización de ADN, siendo esencial para este comportamiento el residuo aminoacídico glicina 434.
7. *SpPol4* es capaz de aceptar y/o inducir desapareamientos transitorios entre el ADN molde y el extremo de las cadenas cebadoras, estabilizados por el deslizamiento del ADN molde o por el nucleótido entrante. Esta propiedad, junto con la presencia de un dominio de interacción BRCT en el extremo N-terminal, sugiere un papel de *SpPol4* en el mecanismo de reparación de NHEJ.
8. *SpPol4* participa *in vivo* en los mecanismos de reparación de roturas de doble cadena de ADN en la fase G1 del ciclo celular.
9. *SpPol4* es capaz de utilizar como molde la base 8-oxoG, una de las lesiones más frecuentes en la célula, mostrando una inserción eficiente pero mutagénica. Asimismo, presenta una elevada eficiencia a la hora de extender los pares generados frente a 8-oxoG. Por tanto *SpPol4* podría participar junto con *SpPol η* , en la tolerancia al daño 8-oxoG asociada a la replicación. Por otro lado, la capacidad de aceptar y extender un par desapareado la capacita para el mecanismo de NHEJ.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbotts, J., SenGupta, D. N., Zon, G., & Wilson, S. H. (1988). Studies on the mechanism of *Escherichia coli* DNA polymerase I large fragment. Effect of template sequence and substrate variation on termination of synthesis. *J Biol Chem*, 263(29), 15094-15103.
- Ahn, J., Kraynov, V. S., Zhong, X., Werneburg, B. G., & Tsai, M. D. (1998). DNA polymerase β : effects of gapped DNA substrates on dNTP specificity, fidelity, processivity and conformational changes. *Biochem J*, 331 (Pt 1), 79-87.
- Ahn, J., Werneburg, B. G., & Tsai, M. D. (1997). DNA polymerase β : structure-fidelity relationship from Pre-steady-state kinetic analyses of all possible correct and incorrect base pairs for wild type and R283A mutant. *Biochemistry*, 36(5), 1100-1107.
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301-313.
- Alleva, J. L., & Doetsch, P. W. (1998). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Rad2 protein, a FEN-1 homolog. *Nucleic Acids Res*, 26(16), 3645-3650.
- Alseth, I., Korvald, H., Osman, F., Seeberg, E., & Bjoras, M. (2004). A general role of the DNA glycosylase Nth1 in the abasic sites cleavage step of base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, 32(17), 5119-5125.
- Alseth, I., Osman, F., Korvald, H., Tsaneva, I., Whitby, M. C., Seeberg, E., et al. (2005). Biochemical characterization and DNA repair pathway interactions of Mag1-mediated base excision repair in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, 33(3), 1123-1131.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402.
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999). DNA polymerase β -like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res*, 27(7), 1609-1618.
- Aylon, Y., Liefshitz, B., & Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J*, 23(24), 4868-4875.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., et al. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 14(10), 943-951.
- Ballmaier, D., & Epe, B. (2006). DNA damage by bromate: mechanism and consequences. *Toxicology*, 221(2-3), 166-171.
- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (1998). Structural insights into DNA polymerase β fidelity: hold tight if you want it right. *Chem Biol*, 5(1), R7-13.

- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2000). Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Mutat Res*, 460(3-4), 231-244.
- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2003). Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, 11(5), 489-496.
- Bebenek, K., García-Díaz, M., Patishall, S. R., & Kunkel, T. A. (2005). Biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV. *J Biol Chem*, 280(20), 20051-20058.
- Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2000). Streisinger revisited: DNA synthesis errors mediated by substrate misalignments. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65, 81-91.
- Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, 69, 137-165.
- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Prasad, R., Wilson, S. H., et al. (2001). 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science*, 291(5511), 2156-2159.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272(32), 19633-19636.
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J. M., Martín, G., & Salas, M. (1989). A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, 59(1), 219-228.
- Bjursell, G., & Skoog, L. (1980). Control of nucleotide pools in mammalian cells. *Antibiot Chemother*, 28, 78-85.
- Blanca, G., Villani, G., Shevelev, I., Ramadan, K., Spadari, S., Hübscher, U., et al. (2004). Human DNA polymerases λ and β show different efficiencies of translesion DNA synthesis past abasic sites and alternative mechanisms for frameshift generation. *Biochemistry*, 43(36), 11605-11615.
- Boiteux, S., Gellon, L., & Guibourt, N. (2002). Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 32(12), 1244-1253.
- Bollum, F. J. (1960). Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem*, 235, PC18-20.
- Boulé, J. B., Rougeon, F., & Papanicolaou, C. (2001). Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J Biol Chem*, 276(33), 31388-31393.
- Braithwaite, D. K., & Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 21(4), 787-802.
- Braithwaite, E. K., Prasad, R., Shock, D. D., Hou, E. W., Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2005). DNA polymerase λ mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 280(18), 18469-18475.

- Budd, M. E., & Campbell, J. L. (1995). Purification and enzymatic and functional characterization of DNA polymerase β -like enzyme, POL4. expressed during yeast meiosis. *Methods Enzymol*, 262, 108-130.
- Burgers, P. M., Koonin, E. V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K. C., Christman, M. F., et al. (2001). Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 276(47), 43487-43490.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 131, 1-87.
- Canitrot, Y., Hoffmann, J. S., Calsou, P., Hayakawa, H., Salles, B., & Cazaux, C. (2000). Nucleotide excision repair DNA synthesis by excess DNA polymerase β : a potential source of genetic instability in cancer cells. *FASEB J*, 14(12), 1765-1774.
- Cann, I. K., & Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics*, 152(4), 1249-1267.
- Cavero, S., Chahwan, C., & Russell, P. (2007). Xlf1 is required for DNA repair by nonhomologous end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 175(2), 963-967.
- Chagovetz, A. M., Sweasy, J. B., & Preston, B. D. (1997). Increased activity and fidelity of DNA polymerase β on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem*, 272(44), 27501-27504.
- Chang, L. M. (1975). The distributive nature of enzymatic DNA synthesis. *J Mol Biol*, 93(2), 219-235.
- Chappell, C., Hanakahi, L. A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., & West, S. C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J*, 21(11), 2827-2832.
- Chen, L., Trujillo, K., Sung, P., & Tomkinson, A. E. (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 275(34), 26196-26205.
- Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M., & Carr, A. M. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene*, 221(1), 59-68.
- Daley, J. M., Laan, R. L., Suresh, A., & Wilson, T. E. (2005). DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*, 280(32), 29030-29037.
- David, S. S., O'Shea, V. L., & Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-950.
- Davies, J. F., 2nd, Almassy, R. J., Hostomska, Z., Ferre, R. A., & Hostomsky, Z. (1994). 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase β . *Cell*, 76(6), 1123-1133.

- Daviet, S., Couve-Privat, S., Gros, L., Shinozuka, K., Ide, H., Sapparbaev, M., et al. (2007). Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway. *DNA Repair (Amst)*, 6(1), 8-18.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G., & Hoeijmakers, J. H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, 13(7), 768-785.
- Decottignies, A. (2007). Microhomology-mediated end joining in fission yeast is repressed by pku70 and relies on genes involved in homologous recombination. *Genetics*, 176(3), 1403-1415.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 21(12), 3192-3200.
- Dianov, G., Price, A., & Lindahl, T. (1992). Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol*, 12(4), 1605-1612.
- Dianov, G. L., Prasad, R., Wilson, S. H., & Bohr, V. A. (1999). Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*, 274(20), 13741-13743.
- Dianov, G. L., Sleeth, K. M., Dianova, II, & Allinson, S. L. (2003). Repair of abasic sites in DNA. *Mutat Res*, 531(1-2), 157-163.
- Doe, C. L., & Whitby, M. C. (2004). The involvement of Srs2 in post-replication repair and homologous recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 32(4), 1480-1491.
- Doherty, A. J., Serpell, L. C., & Ponting, C. P. (1996). The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res*, 24(13), 2488-2497.
- Dominguez, O., Ruiz, J. F., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M. A., Kirchhoff, T., et al. (2000). DNA polymerase μ (Pol μ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J*, 19(7), 1731-1742.
- Dvir, A., Peterson, S. R., Knuth, M. W., Lu, H., & Dynan, W. S. (1992). Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(24), 11920-11924.
- Dynan, W. S., & Yoo, S. (1998). Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 26(7), 1551-1559.
- Efrati, E., Tocco, G., Eritja, R., Wilson, S. H., & Goodman, M. F. (1997). Abasic translesion synthesis by DNA polymerase β violates the "A-rule". Novel types of nucleotide incorporation by human DNA polymerase β at an abasic lesion in different sequence contexts. *J Biol Chem*, 272(4), 2559-2569.
- Ekwall, K., & Ruusala, T. (1991). Budding yeast *CAN1* gene as a selection marker in fission yeast. *Nucleic Acids Res*, 19(5), 1150.

- Fan, W., & Wu, X. (2004). DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(4), 1328-1333.
- Fantes, P. A., & Creanor, J. (1984). Canavanine resistance and the mechanism of arginine uptake in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol*, 130(12), 3265-3273.
- Ferreira, M. G., & Cooper, J. P. (2004). Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev*, 18(18), 2249-2254.
- Forsburg, S. L., & Sherman, D. A. (1997). General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene*, 191(2), 191-195.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., & Dogliotti, E. (2003). The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, 85(11), 1053-1071.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L. C., London, R. E., & Kunkel, T. A. (2005). Structure-function studies of DNA polymerase λ . *DNA Repair (Amst)*, 4(12), 1358-1367.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Blanco, L., Kunkel, T. A., & Pedersen, L. C. (2004). A structural solution for the DNA polymerase λ -dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol Cell*, 13(4), 561-572.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., & Blanco, L. (2001). Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase λ : a possible role in base excision repair. *J Biol Chem*, 276(37), 34659-34663.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Sabariego, R., Domínguez, O., Rodríguez, J., Kirchhoff, T., et al. (2002). DNA polymerase λ , a novel DNA repair enzyme in human cells. *J Biol Chem*, 277(15), 13184-13191.
- García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L. A., de Lera, L. T., Saniger, M. L., Ruiz, J. F., et al. (2000). DNA polymerase λ (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, 301(4), 851-867.
- García-Escudero, R., García-Díaz, M., Salas, M. L., Blanco, L., & Salas, J. (2003). DNA polymerase X of African swine fever virus: insertion fidelity on gapped DNA substrates and AP lyase activity support a role in base excision repair of viral DNA. *J Mol Biol*, 326(5), 1403-1412.
- Gellon, L., Carson, D. R., Carson, J. P., & Demple, B. (2008). Intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in *Saccharomyces cerevisiae* Trf4 protein with a possible role in base excision DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, 7(2), 187-198.
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541-1553.
- Gottlieb, T. M., & Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), 131-142.

- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., et al. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641), 492-495.
- Greenberg, M. M., Weledji, Y. N., Kroeger, K. M., Kim, J., & Goodman, M. F. (2004). In vitro effects of a C4'-oxidized abasic site on DNA polymerases. *Biochemistry*, 43(9), 2656-2663.
- Grollman, A. P., & Moriya, M. (1993). Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet*, 9(7), 246-249.
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580.
- Haracska, L., Yu, S. L., Johnson, R. E., Prakash, L., & Prakash, S. (2000). Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase η . *Nat Genet*, 25(4), 458-461.
- Harrison, L., Hatahet, Z., & Wallace, S. S. (1999). In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites. *J Mol Biol*, 290(3), 667-684.
- Hasan, S., El-Andaloussi, N., Hardeland, U., Hassa, P. O., Burki, C., Imhof, R., et al. (2002). Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase β . *Mol Cell*, 10(5), 1213-1222.
- Hashim, M. F., Schnetz-Boutaud, N., & Marnett, L. J. (1997). Replication of template-primers containing propanodeoxyguanosine by DNA polymerase β . Induction of base pair substitution and frameshift mutations by template slippage and deoxynucleoside triphosphate stabilization. *J Biol Chem*, 272(32), 20205-20212.
- Hazra, T. K., Muller, J. G., Manuel, R. C., Burrows, C. J., Lloyd, R. S., & Mitra, S. (2001). Repair of hydantoins, one electron oxidation product of 8-oxoguanine, by DNA glycosylases of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 29(9), 1967-1974.
- Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, 4(6), 639-648.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C., et al. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1), 288-293.
- Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R. S., Bruce, C. K., Kysela, B., Green, A. J., et al. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem*, 281(49), 37517-37526.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), 135-141.

- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374.
- Hoffmann, W. (1985). Molecular characterization of the *CAN1* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. A transmembrane protein without N-terminal hydrophobic signal sequence. *J Biol Chem*, 260(21), 11831-11837.
- Horton, J. K., Prasad, R., Hou, E., & Wilson, S. H. (2000). Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase β -dependent long patch base excision repair. *J Biol Chem*, 275(3), 2211-2218.
- Horton, J. K., Srivastava, D. K., Zmudzka, B. Z., & Wilson, S. H. (1995). Strategic down-regulation of DNA polymerase β by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res*, 23(19), 3810-3815.
- Hübscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, 71, 133-163.
- Huen, M. S., & Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res*, 18(1), 8-16.
- Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*, 431(7011), 1011-1017.
- Ischenko, A. A., & Sapparbaev, M. K. (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415(6868), 183-187.
- Ishchenko, A. A., Ide, H., Ramotar, D., Nevinsky, G., & Sapparbaev, M. (2004). α -anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases. *Biochemistry*, 43(48), 15210-15216.
- Ishchenko, A. A., Sanz, G., Privezentzev, C. V., Maksimenko, A. V., & Sapparbaev, M. (2003). Characterisation of new substrate specificities of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* AP endonucleases. *Nucleic Acids Res*, 31(21), 6344-6353.
- Ishchenko, A. A., Yang, X., Ramotar, D., & Sapparbaev, M. (2005). The 3'->5' exonuclease of Apn1 provides an alternative pathway to repair 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 25(15), 6380-6390.
- Ito, J., & Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res*, 19(15), 4045-4057.
- Jenkins, T. M., Saxena, J. K., Kumar, A., Wilson, S. H., & Ackerman, E. J. (1992). DNA polymerase β and DNA synthesis in *Xenopus* oocytes and in a nuclear extract. *Science*, 258(5081), 475-478.
- Jiménez, A., & Davies, J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature*, 287(5785), 869-871.
- Joyce, C. M. (1997). Choosing the right sugar: how polymerases select a nucleotide substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1619-1622.
- Juárez, R., Ruiz, J. F., Nick McElhinny, S. A., Ramsden, D., & Blanco, L. (2006). A

- specific loop in human DNA polymerase μ allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic Acids Res*, 34(16), 4572-4582.
- Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (2002). Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol*, 12(5), 397-402.
- Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D. J., Sgouros, J., et al. (1999). Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem*, 274(34), 24187-24194.
- Kawanishi, S., & Murata, M. (2006). Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology*, 221(2-3), 172-178.
- Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A. P., et al. (1991). NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry*, 30(5), 1403-1412.
- Kumar, A., Widen, S. G., Williams, K. R., Kedar, P., Karpel, R. L., & Wilson, S. H. (1990). Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase β . Identification of a discrete template binding domain. *J Biol Chem*, 265(4), 2124-2131.
- Kunkel, T. A. (1985). The mutational specificity of DNA polymerase- β during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem*, 260(9), 5787-5796.
- Kunkel, T. A. (1986). Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro*. *J Biol Chem*, 261(29), 13581-13587.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem*, 279(17), 16895-16898.
- Kunkel, T. A., & Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, 69, 497-529.
- Lee, K., & Lee, S. E. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Sae2- and Tel1-dependent single-strand DNA formation at DNA break promotes microhomology-mediated end joining. *Genetics*, 176(4), 2003-2014.
- Leem, S. H., Ropp, P. A., & Sugino, A. (1994). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV: possible involvement in double strand break DNA repair. *Nucleic Acids Res*, 22(15), 3011-3017.
- Lehman, I. R., Zimmerman, S. B., Adler, J., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. V. Chemical Composition of Enzymatically Synthesized Deoxyribonucleic Acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 44(12), 1191-1196.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 283(1), 1-5.
- Lindahl, T. (1990). Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res*, 238(3), 305-311.

- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-1905.
- Lipscomb, L. A., Peek, M. E., Morningstar, M. L., Verghis, S. M., Miller, E. M., Rich, A., et al. (1995). X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(3), 719-723.
- Longley, M. J., Prasad, R., Srivastava, D. K., Wilson, S. H., & Copeland, W. C. (1998). Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase γ and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12244-12248.
- Lu, A. L., & Fawcett, W. P. (1998). Characterization of the recombinant MutY homolog, an adenine DNA glycosylase, from yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 273(39), 25098-25105.
- Luan, Y., Suzuki, T., Palanisamy, R., Takashima, Y., Sakamoto, H., Sakuraba, M., et al. (2007). Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res*, 619(1-2), 113-123.
- Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle*, 4(9), 1193-1200.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., et al. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell*, 16(5), 701-713.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108(6), 781-794.
- Maciejewski, M. W., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M. A., et al. (2001). Solution structure of a viral DNA repair polymerase. *Nat Struct Biol*, 8(11), 936-941.
- Madril, A. C., Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, L., & Prakash, S. (2001). Fidelity and damage bypass ability of *Schizosaccharomyces pombe* Eso1 protein, comprised of DNA polymerase η and sister chromatid cohesion protein Ctf7. *J Biol Chem*, 276(46), 42857-42862.
- Maga, G., Blanca, G., Shevelev, I., Frouin, I., Ramadan, K., Spadari, S., et al. (2004). The human DNA polymerase λ interacts with PCNA through a domain important for DNA primer binding and the interaction is inhibited by p21/WAF1/CIP1. *FASEB J*, 18(14), 1743-1745.
- Maga, G., Crespan, E., Wimmer, U., van Loon, B., Amoroso, A., Mondello, C., et al. (2008). Replication protein A and proliferating cell nuclear antigen coordinate DNA polymerase selection in 8-oxo-guanine repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), 20689-20694.

- Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B., *et al.* (2007). 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*, 447(7144), 606-608.
- Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., *et al.* (2002). Human DNA polymerase λ functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. *J Biol Chem*, 277(50), 48434-48440.
- Mahajan, K. N., Nick McElhinny, S. A., Mitchell, B. S., & Ramsden, D. A. (2002). Association of DNA polymerase μ (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 22(14), 5194-5202.
- Mangal, D., Vudathala, D., Park, J. H., Lee, S. H., Penning, T. M., & Blair, I. A. (2009). Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 22(5), 788-797.
- Manolis, K. G., Nimmo, E. R., Hartsuiker, E., Carr, A. M., Jeggo, P. A., & Allshire, R. C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, 20(1-2), 210-221.
- Matsumoto, Y., & Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase β during DNA repair. *Science*, 269(5224), 699-702.
- McAuley-Hecht, K. E., Leonard, G. A., Gibson, N. J., Thomson, J. B., Watson, W. P., Hunter, W. N., *et al.* (1994). Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry*, 33(34), 10266-10270.
- McCormick, P. J., Danhauser, L. L., Rustum, Y. M., & Bertram, J. S. (1983). Changes in ribo- and deoxyribonucleoside triphosphate pools within the cell cycle of a synchronized mouse fibroblast cell line. *Biochim Biophys Acta*, 756(1), 36-40.
- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*, 24(11), 529-538.
- Memisoglu, A., & Samson, L. (2000a). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res*, 451(1-2), 39-51.
- Memisoglu, A., & Samson, L. (2000b). Contribution of base excision repair, nucleotide excision repair, and DNA recombination to alkylation resistance of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol*, 182(8), 2104-2112.
- Meuth, M. (1984). The genetic consequences of nucleotide precursor pool imbalance in mammalian cells. *Mutat Res*, 126(2), 107-112.
- Michel, B., Ehrlich, S. D., & Uzest, M. (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J*, 16(2), 430-438.
- Mills, K. D., Ferguson, D. O., & Alt, F. W. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev*, 194, 77-95.
- Moreno, S., Klar, A., & Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, 194, 795-823.

- Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M., & Limoli, C. L. (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res*, 146(3), 247-258.
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC@TA transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3), 1122-1126.
- Neeley, W. L., & Essigmann, J. M. (2006). Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol*, 19(4), 491-505.
- Nicholl, I. D., Nealon, K., & Kenny, M. K. (1997). Reconstitution of human base excision repair with purified proteins. *Biochemistry*, 36(24), 7557-7566.
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., García-Díaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., et al. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*, 19(3), 357-366.
- Nick McElhinny, S. A., & Ramsden, D. A. (2003). Polymerase μ is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Mol Cell Biol*, 23(7), 2309-2315.
- Nick McElhinny, S. A., & Ramsden, D. A. (2004). Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev*, 200, 156-164.
- Nilsen, H., & Krokan, H. E. (2001). Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, 22(7), 987-998.
- Nowak, R., Woszczyński, M., & Siedlecki, J. A. (1990). Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination. *Exp Cell Res*, 191(1), 51-56.
- Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, 256(5518), 547-551.
- Oda, N., Saxena, J. K., Jenkins, T. M., Prasad, R., Wilson, S. H., & Ackerman, E. J. (1996). DNA polymerases α and β are required for DNA repair in an efficient nuclear extract from *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 271(23), 13816-13820.
- Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., et al. (1991). NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res*, 19(7), 1407-1412.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., et al. (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell*, 8(1), 7-8.
- Oliveros, M., Yanez, R. J., Salas, M. L., Salas, J., Vinuela, E., & Blanco, L. (1997). Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem*, 272(49), 30899-30910.
- Osheroff, W. P., Jung, H. K., Beard, W. A., Wilson, S. H., & Kunkel, T. A. (1999). The fidelity of DNA polymerase β during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem*, 274(6), 3642-3650.

- Osman, F., Bjoras, M., Alseth, I., Morland, I., McCready, S., Seeberg, E., et al. (2003). A new *Schizosaccharomyces pombe* base excision repair mutant, *nth1*, reveals overlapping pathways for repair of DNA base damage. *Mol Microbiol*, 48(2), 465-480.
- Pagès, V., & Fuchs, R. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*, 21(58), 8957-8966.
- Paques, F., & Haber, J. E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(2), 349-404.
- Pardo, B., Ma, E., & Marcand, S. (2006). Mismatch tolerance by DNA polymerase Pol4 in the course of nonhomologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 172(4), 2689-2694.
- Pavlov, Y. I., Shcherbakova, P. V., & Rogozin, I. B. (2006). Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int Rev Cytol*, 255, 41-132.
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase β , a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, 264(5167), 1891-1903.
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996). Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry*, 35(39), 12742-12761.
- Picher, A. J., & Blanco, L. (2007). Human DNA polymerase λ is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)*, 6(12), 1749-1756.
- Piersen, C. E., McCullough, A. K., & Lloyd, R. S. (2000). AP lyases and dRPases: commonality of mechanism. *Mutat Res*, 459(1), 43-53.
- Piersen, C. E., Prasad, R., Wilson, S. H., & Lloyd, R. S. (1996). Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase β deoxyribose phosphate excision reaction. *J Biol Chem*, 271(30), 17811-17815.
- Pinz, K. G., & Bogenhagen, D. F. (2000). Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase γ and other family A DNA polymerases. *J Biol Chem*, 275(17), 12509-12514.
- Plug, A. W., Clairmont, C. A., Sapi, E., Ashley, T., & Sweasy, J. B. (1997). Evidence for a role for DNA polymerase β in mammalian meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4), 1327-1331.
- Podlutzky, A. J., Dianova, II, Podust, V. N., Bohr, V. A., & Dianov, G. L. (2001a). Human DNA polymerase β initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J*, 20(6), 1477-1482.
- Podlutzky, A. J., Dianova, II, Wilson, S. H., Bohr, V. A., & Dianov, G. L. (2001b). DNA synthesis and dRPase activities of polymerase β are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry*,

40(3), 809-813.

- Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, 74, 317-353.
- Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., & Wilson, S. H. (1998a). Human DNA polymerase β deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, 273(24), 15263-15270.
- Prasad, R., Beard, W. A., Chyan, J. Y., Maciejewski, M. W., Mullen, G. P., & Wilson, S. H. (1998b). Functional analysis of the amino-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase β as revealed by site-directed mutagenesis. DNA binding and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities. *J Biol Chem*, 273(18), 11121-11126.
- Prasad, R., Beard, W. A., & Wilson, S. H. (1994). Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase β . Dependence on 5'-phosphate group. *J Biol Chem*, 269(27), 18096-18101.
- Prasad, R., Dianov, G. L., Bohr, V. A., & Wilson, S. H. (2000). FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem*, 275(6), 4460-4466.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J., et al. (2001). DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem*, 276(35), 32411-32414.
- Prasad, R., Widen, S. G., Singhal, R. K., Watkins, J., Prakash, L., & Wilson, S. H. (1993). Yeast open reading frame YCR14C encodes a DNA β -polymerase-like enzyme. *Nucleic Acids Res*, 21(23), 5301-5307.
- Prudden, J., Evans, J. S., Hussey, S. P., Deans, B., O'Neill, P., Thacker, J., et al. (2003). Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *EMBO J*, 22(6), 1419-1430.
- Ruiz, J. F., Domínguez, O., Lain de Lera, T., García-Díaz, M., Bernad, A., & Blanco, L. (2001). DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1405), 99-109.
- Ruiz, J. F., Juárez, R., García-Díaz, M., Terrados, G., Picher, A. J., González-Barrera, S., et al. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol μ requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res*, 31(15), 4441-4449.
- Ruiz, J. F., Lucas, D., García-Palomero, E., Saez, A. I., González, M. A., Piris, M. A., et al. (2004). Overexpression of human DNA polymerase μ (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res*, 32(19), 5861-5873.
- Russell, P., & Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by *wee1*⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*, 49(4), 559-567.
- Rydberg, B., & Game, J. (2002). Excision of misincorporated ribonucleotides in DNA by RNase H (type 2) and FEN-1 in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*,

99(26), 16654-16659.

- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 60, 39-71.
- Sawaya, M. R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Crystal structure of rat DNA polymerase β : evidence for a common polymerase mechanism. *Science*, 264(5167), 1930-1935.
- Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., & Pelletier, H. (1997). Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, 36(37), 11205-11215.
- Schofield, M. J., & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol*, 57, 579-608.
- Shevelev, I. V., & Hubscher, U. (2002). The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5), 364-376.
- Shimazaki, N., Yazaki, T., Kubota, T., Sato, A., Nakamura, A., Kurei, S., et al. (2005). DNA polymerase λ directly binds to proliferating cell nuclear antigen through its confined C-terminal region. *Genes Cells*, 10(7), 705-715.
- Shimazaki, N., Yoshida, K., Kobayashi, T., Toji, S., Tamai, K., & Koiwai, O. (2002). Over-expression of human DNA polymerase λ in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Genes Cells*, 7(7), 639-651.
- Shinohara, A., & Ogawa, T. (1995). Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem Sci*, 20(10), 387-391.
- Showalter, A. K., Byeon, I. J., Su, M. I., & Tsai, M. D. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nat Struct Biol*, 8(11), 942-946.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, 18(1), 134-147.
- Siede, W., Friedl, A. A., Dianova, I., Eckardt-Schupp, F., & Friedberg, E. C. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics*, 142(1), 91-102.
- Singhal, R. K., Prasad, R., & Wilson, S. H. (1995). DNA polymerase β conducts the gap-filling step in uracil-initiated base excision repair in a bovine testis nuclear extract. *J Biol Chem*, 270(2), 949-957.
- Singhal, R. K., & Wilson, S. H. (1993). Short gap-filling synthesis by DNA polymerase β is processive. *J Biol Chem*, 268(21), 15906-15911.
- Sipiczki, M. (1995). Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68(2), 119-149.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531(1-2), 231-251.

- Smith, C. L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J. B., Yanagida, M., *et al.* (1987). An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 15(11), 4481-4489.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., *et al.* (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair. *Nature*, 379(6561), 183-186.
- Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X. P., Horton, J. K., *et al.* (2000). The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, 405(6788), 807-810.
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10), 1021-1029.
- Srivastava, D. K., Berg, B. J., Prasad, R., Molina, J. T., Beard, W. A., Tomkinson, A. E., *et al.* (1998). Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem*, 273(33), 21203-21209.
- Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem*, 274(25), 17395-17398.
- Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jager, J., & Joyce, C. M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, 266(5193), 2022-2025.
- Sterling, C. H., & Sweasy, J. B. (2006). DNA polymerase 4 of *Saccharomyces cerevisiae* is important for accurate repair of methyl-methanesulfonate-induced DNA damage. *Genetics*, 172(1), 89-98.
- Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., & Koyama, H. (2000). Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β . *EMBO J*, 19(6), 1397-1404.
- Suto, K., Nagata, A., Murakami, H., & Okayama, H. (1999). A double-strand break repair component is essential for S phase completion in fission yeast cell cycling. *Mol Biol Cell*, 10(10), 3331-3343.
- Sweasy, J. B., Chen, M., & Loeb, L. A. (1995). DNA polymerase β can substitute for DNA polymerase I in the initiation of plasmid DNA replication. *J Bacteriol*, 177(10), 2923-2925.
- Sweasy, J. B., & Loeb, L. A. (1992). Mammalian DNA polymerase β can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 267(3), 1407-1410.
- Symington, L. S. (2002). Role of *RAD52* epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(4), 630-670, table of contents.
- Tanaka, K., Yonekawa, T., Kawasaki, Y., Kai, M., Furuya, K., Iwasaki, M., *et al.* (2000).

- Fission yeast Eso1p is required for establishing sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell Biol*, 20(10), 3459-3469.
- Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, 140(1), 1-22.
- Tseng, H. M., & Tomkinson, A. E. (2002). A physical and functional interaction between yeast Pol4 and Dnl4-Lif1 links DNA synthesis and ligation in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*, 277(47), 45630-45637.
- Tseng, H. M., & Tomkinson, A. E. (2004). Processing and joining of DNA ends coordinated by interactions among Dnl4/Lif1, Pol4, and FEN-1. *J Biol Chem*, 279(46), 47580-47588.
- Ulrich, H. D. (2004). How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle*, 3(1), 15-18.
- van den Bosch, M., Vreeken, K., Zonneveld, J. B., Brandsma, J. A., Lombaerts, M., Murray, J. M., et al. (2001). Characterization of RAD52 homologs in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutat Res*, 461(4), 311-323.
- van der Kemp, P. A., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., & Boiteux, S. (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(11), 5197-5202.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., & Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 1793-1808.
- Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607-614.
- Ward, J. F. (2000). Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65, 377-382.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Werneburg, B. G., Ahn, J., Zhong, X., Hondal, R. J., Kraynov, V. S., & Tsai, M. D. (1996). DNA polymerase β : pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity. *Biochemistry*, 35(22), 7041-7050.
- Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (1999). Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase β (Pol4)-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274(33), 23599-23609.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871-880.
- Yaneva, M., Kowalewski, T., & Lieber, M. R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy

- studies. *EMBO J*, 16(16), 5098-5112.
- Yang, W. (2005). Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett*, 579(4), 868-872.
- Yonekura, S., Nakamura, N., Doi, T., Sugiyama, H., Yamamoto, K., Yonei, S., *et al.* (2007). Recombinant *Schizosaccharomyces pombe* Nth1 protein exhibits DNA glycosylase activities for 8-oxo-7,8-dihydroguanine and thymine residues oxidized in the methyl group. *J Radiat Res (Tokyo)*, 48(5), 417-424.
- Yuan, F., Zhang, Y., Rajpal, D. K., Wu, X., Guo, D., Wang, M., *et al.* (2000). Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase η . *J Biol Chem*, 275(11), 8233-8239.
- Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., Xie, Z., & Wang, Z. (2001). Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase μ . *Mol Cell Biol*, 21(23), 7995-8006.
- Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Rechkoblit, O., Taylor, J. S., Geacintov, N. E., *et al.* (2000). Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η . *Nucleic Acids Res*, 28(23), 4717-4724.

ANEXO

I. Abreviaturas

8-oxoG, 8G	7,8-dihidro-8-oxoguanina
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-PK	Quinasa dependiente de ADN
AP	Apurínico/apirimidínico
APE	AP endonucleasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BER	Reparación por escisión de base (<i>B</i> <u>ase</u> <i>E</i> <u>xcision</u> <i>R</i> <u>epair</u>)
BIR	Recombinación inducida por rotura (<i>B</i> <u>reak</u> - <i>I</i> <u>nduced</u> <i>R</i> <u>eplication</u>)
BRCT	Dominio <u>B</u> RC <u>A</u> 1 <u>C</u> -terminal
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado centígrado
cpm	<u>C</u> uentas por <u>m</u> inuto
CPT	Camptotecina
C-terminal	Carboxilo terminal
ATP	Adenosina 5' trifosfato
dAMP	2' desoxiadenosina 5' monofosfato
dATP	2' desoxiadenosina 5' trifosfato
dCMP	2' desoxicitosina 5' monofosfato
dCTP	2' desoxicitosina 5' trifosfato
dGMP	2' desoxiguanosina 5' monofosfato
dGTP	2' desoxiguanosina 5' trifosfato
dTTP	2' desoxitimidina 5' trifosfato
dUTP	2' desoxiuridina 5' trifosfato
dNMP	Desoxinucleósido monofosfato
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
dRP	Desoxirribosa fosfato
D-loop	Lazo D (<i>D</i> <u>isplacement</u> <i>l</i> <u>oop</u>)
DSB	Rotura de doble cadena de ADN (<i>D</i> <u>ouble</u> <i>S</i> <u>trand</u> <i>B</i> <u>reak</u>)

DSBR	Reparación de roturas de doble cadena en el ADN (<i><u>D</u>ouble <u>S</u>trand <u>B</u>reak <u>R</u>epair</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra acético
EMM	Medio mínimo de <i>S. pombe</i> (<i><u>E</u>dinburgh <u>m</u>inimal <u>m</u>edium</i>)
EMSA	Ensayo de retraso en gel
FEN-1	<i><u>F</u>lap <u>e</u>ndon<u>u</u>clease 1</i>
GC	Conversión génica (<i><u>G</u>ene <u>C</u>onversion</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i><u>G</u>reen <u>F</u>luorescent <u>P</u>rotein</i>)
GG	Genoma global (<i><u>G</u>lobal <u>G</u>enome</i>)
GST	<i><u>G</u>luthathion <u>S</u> transferasa</i>
Gy	Gray
h	Hora
HJ	Unión de Holliday (<i><u>H</u>olliday <u>j</u>unction</i>)
dHJ	Intermedio de Holliday
HR	Recombinación homóloga (<i><u>H</u>omologous <u>R</u>ecombination</i>)
HU	Hidroxiurea
IR	Radiación ionizante (<i><u>I</u>onizing <u>R</u>adiation</i>)
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
mA	Miliamperio
M/C	ADN tipo molde / cebador abierto
MDS	Sitios con daños múltiples (<i><u>M</u>ultiple <u>D</u>amage <u>S</u>ites</i>)
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón
Mg²⁺	Ion magnesio
Mn²⁺	Ion manganeso
min	Minuto
MMEJ	Unión de extremos mediante microhomología (<i><u>M</u>icrohomology-<u>M</u>ediated <u>E</u>nd-<u>J</u>oining</i>)
MMR	Reparación de apareamientos erróneos (<i><u>M</u>ismatch <u>R</u>epair</i>)

MMS	Metil metano-sulfonato
MSEV	<i>Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus</i>
NER	Reparación por escisión de nucleótido (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (<i>Non-Homologous End-Joining</i>)
NIR	Reparación por incisión de nucleótido (<i>Nucleotide Incision Repair</i>)
NLS	Secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
nt, mer	Nucleótido
N-terminal	Amino terminal
OH	Grupo hidroxilo
P	Grupo fosfato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNK	Polinucleótido quinasa
Pol	Polimerasa
RFC	Factor de replicación C (<i>Replication Factor C</i>)
rCTP	Ribocitosina trifosfato
rGTP	Riboguanosina trifosfato
rTTP	Ribotimidina trifosfato
rUTP	Ribouridina trifosfato
rNTP	Ribonucleósido trifosfato
rNMP	ribonucleósido monofosfato
RPA	Proteína replicativa A (<i>Replication Protein A</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies de oxígeno reactivas (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
SDSA	Síntesis dependiente del alineamiento de cadena (<i>S</i> <u>íntesis</u> <i>D</i> <u>ependent</u> <i>S</i> <u>trand</u> <i>A<u>nnealing</u>)</i>
SSA	Alineamiento de cadena sencilla (<i>S</i> <u>ingle</u> - <i>S</i> <u>trand</u> <i>A<u>nnealing</u>)</i>
SSB	Rotura de cadena simple de ADN (<i>S</i> <u>ingle</u> <i>S</i> <u>trand</u> <i>B</i> <u>reak</u>)
TAE	Tampón Tris-acétato-EDTA
TCR	Reparación asociada a la transcripción (<i>T</i> <u>ranscription</u> - <i>C</i> <u>oupled</u> <i>R</i> <u>epair</u>)
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TLS	Síntesis a través de lesiones (<i>T</i> <u>rans</u> <i>lesion</i> <i>S</i> <u>ynthesis</u>)
UDG	Uracil ADN glicosilasa
UV	Ultravioleta
v	voltio
VPPA	Virus de la peste porcina africana
<i>wt</i>	<i>w</i> <u>ild</u> - <i>t</i> <u>ype</u>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranósido

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina: Ala, A	Leucina: Leu, L
Arginina: Arg, R	Lisina: Lys, K
Ácido aspártico: Asp, D	Metionina: Met, M
Asparagina: Asn, N	Fenilalanina: Phe, F
Cisteína: Cys, C	Prolina: Pro, P
Ácido glutámico: Glu, E	Serina: Ser, S
Glicina: Gly, G	Tirosina: Tyr, Y
Glutamina: Gln, Q	Treonina: Thr, T
Histidina: His, H	Triptófano: Trp, W
Isoleucina: Ile, I	Valina: Val, V

II. Glosario

En esta memoria se ha tratado de evitar el uso de anglicismos. Sin embargo, en algunos casos se ha preferido mantener el término original, bien por no existir una correspondencia adecuada en castellano o bien por estar su uso muy generalizado en el lenguaje científico.

Downstream: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de ADN que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 5' de un *gap*.

Flap: extremo de cadena sencilla de ADN que se genera por desplazamiento del extremo 5' de un *gap* o por alineamiento incompleto de cadenas parcialmente complementarias.

Gap: hueco de longitud variable en el ADN, que supone una región de cadena sencilla embebida en un ADN de doble cadena.

Upstream: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de ADN que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 3' de un *gap*.

wild-type: tipo silvestre, sin modificación genética.

AGRADECIMIENTOS

No me gustaría concluir esta Tesis sin reflejar mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a todas las personas que han contribuido a la realización del trabajo que aquí se recoge.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, el Dr. Luis Blanco, el haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo y, desde el principio, la confianza depositada en mí para que este trabajo saliera adelante.

A los compañeros de laboratorio de mis inicios que me acogieron enseguida como uno más: a Sergio por compartir conmigo su trabajo, sus enseñanzas, discusiones, consejos y, a pesar de la distancia, siempre sacar un minuto para mí; a Ángel por escucharme tantas veces, por sus sabios consejos y todas las risas que nos hemos echado...; a Raquel por su apoyo y ayuda; y especialmente a Gloria, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del labo, por su amistad, sus palabras de ánimo y siempre ofrecerme la mejor de sus sonrisas. ¡A todos mil gracias!

A mis compañeros actuales: Ana ("la Gómez"), Sara, M^{ra} José, María, Verónica, Susana, Ana ("Anaza") y Marivi por aguantarme, hacer ameno el día a día y por su disposición a ayudar en cualquier momento ante cualquier dificultad. Por supuesto no me podría olvidar de los compañeros que a lo largo de estos años han pasado por el laboratorio: Sandra, Jose, María S., Paula y Francisco. Y por supuesto a Ana Alonso por todas esas cenas tan divertidas...

Al Dr. Aidan Doherty por invitarme a su laboratorio de Brighton dándome la oportunidad de aprender cosas nuevas, por su interés e interesantes aportaciones al trabajo. No me puedo olvidar de Pierre, Robbie, Evelyn, Wei, Rolf, Laura, Kety, Hilfred, Sandia y Arswin que se preocuparon de que estuviera a gusto, y especialmente a Felipe y María agradeceros vuestra hospitalidad y esas tardes de pintas...

A la gente del antiguo 310 (actual 103) que me acogieron en mis inicios cuando era estudiante, me enseñaron tanto científica como personalmente y donde hice grandes amistades. Millones de gracias: Jorge, Alberto, Deyi, David, Paco, M^{ra} Carmen y Juan Pedro (por darme mi primera oportunidad). En especial a mis niñas Verónica, María y Charo por tantos buenos momentos y a Cruz porque gracias a su confianza en mí ahora estoy escribiendo estas palabras.

A la gente del antiguo 121 (lo siento, pero ahora estáis desperdigados y no os ubico en el nuevo centro): Brian, Blanca, Asun, Vanesa, Victoria, M^{ra} Angeles y Jose Antonio. Agradeceros todos vuestros enzimas, reactivos, aparatos, conocimientos, consejos... sin vosotros el trabajo hubiera sido mucho más complicado.

No me puedo olvidar de la gente de pombe que me ha ayudado desde la distancia (Sevilla, Salamanca y Nueva York) a lo largo de estos años: a Fernando y sus plásmidos; Sergio Moreno y Ana Elisa por su inestimable ayuda con el cruce del dichoso mutante wee y muy especialmente a Aurelia, que siempre ha hecho lo imposible por ayudar.

A la gente de los laboratorios de Margarita y Marisa Salas por vuestra buena disposición siempre que he acudido a vosotros.

Al personal de los servicios del CBM, especialmente a seguridad biológica e instrumentación que me han facilitado tanto el trabajo y me han sacado de un apuro en más de una ocasión.

A mis niñas del CBM: Carola, Macarena, Elena, Prado, Mónica K., Mónica H. y Pepa. Y por supuesto a Rubén (una más) y su ciencia divertida!! Muchas gracias por aguantarme y apoyarme durante todo este tiempo, sé que ha sido duro, pero sobre todo quiero agradeceros las cantidad de buenos ratos que hemos pasado juntos.

A mis amigos de la Facultad por hacer inolvidables aquellos maravillosos años y en especial a Fátima, Irene y Rodolfo, que aunque no nos vemos tan asiduamente como nos gustaría siempre estáis ahí.

A Asun por su amistad durante estos años y su interés sobre lo que hago, tu también has formado parte de esta Tesis.

A mi prima Ana con quien he compartido tantas experiencias, confidencias y risas, por ser más que familia y aunque no hablemos en meses siempre parece que

fue ayer. ¡Gracias pima Lary!

Y finalmente a las personas a las que dedico esta Tesis, mi familia porque ellos la han vivido desde el punto más personal y porque gracias a ellos soy como soy: a mis padres Alfonso y Emilia por todos sus esfuerzos, su educación y por siempre apoyarme en mis decisiones; a mi hermana Mayte por estar siempre a mi lado apoyándome y escuchándome, gracias por compartir con paciencia este periodo de mi vida; a mi abuela Julia por haberme cuidado y criado, por haber sido una abuela tan especial y excepcional, porque cada día te echo más de menos, seguro que estarías orgullosa de mí... A mi sobrino Alejandro por ser tan cariñoso y simpático, por transmitirme tanta alegría, ¡te adoro!. Y finalmente a mi cuñado Joaquín por tantos puntos de vista intercambiados y ante todo por hacer feliz a mi hermana.

Pues eso es todo, siéntense y disfruten. Va por vosotros...